

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-510334
(P2003-510334A)

(43) 公表日 平成15年3月18日 (2003.3.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマート (参考)
A 6 1 K 38/00	Z N A	A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 2 4
39/00		39/04	4 B 0 6 5
39/04		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 31/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/06		35/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 125 頁) 最終頁に続く			

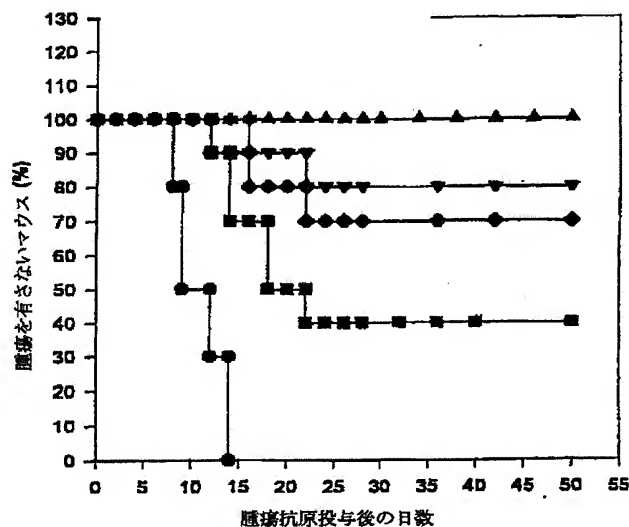
(21) 出願番号 特願2001-526571(P2001-526571)
(86) (22) 出願日 平成12年9月29日 (2000.9.29)
(85) 翻訳文提出日 平成14年4月1日 (2002.4.1)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 2 7 0 2 3
(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 2 3 4 2 1
(87) 国際公開日 平成13年4月5日 (2001.4.5)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 5 6 , 8 2 1
(32) 優先日 平成11年9月30日 (1999.9.30)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 6 3 , 1 3 8
(32) 優先日 平成11年11月2日 (1999.11.2)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 コリクサ コーポレイション
アメリカ合衆国 ワシントン 98104,
シアトル, コロンビア ストリート
1124, スイート 200
(71) 出願人 ヘルス リサーチ インコーポレイテッド
Health Research, In
c.
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 14263、
バッファロー、エルム アンド カールト
ン ストリーツ (番地なし)、ロズウェル
パーク キャンサー インスティテュー
ト ディヴィジョン内
(74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌及び感染症の予防及び治療のためのストレスタンパク質組成物及び方法

(57) 【要約】

ストレスタンパク質複合体およびこのような複合体をコードする関連分子またはこのような分子を提示する細胞を含む薬学的組成物が提供される。ストレスタンパク質複合体は、免疫原性ポリペプチドと複合体化されたhsp110またはgrp170ポリペプチドを含む。ストレスタンパク質複合体の免疫原性ポリペプチドは癌または感染症に関連し得る。本発明の薬学的組成物は被検体に投与することができ、それにより、ヒト型結核菌(M. tuberculosis)感染を阻害する方法、腫瘍増殖を阻害する方法、癌の発生を阻害する方法、および感染症を治療または予防する方法が提供される。本発明は、T細胞を、hsp110またはgrp170ポリペプチドおよび腫瘍またはヒト型結核菌感染細胞に関連する免疫原性ポリペプチドを提示するように改変されたAPCと接触させる、腫瘍細胞またはヒト型結核菌感染細胞に向かうT細胞を産生する方法をさらに提供する。この方法により産生されるT細胞およびこのようなT細胞を含む薬学的組成物が本発明に含まれる。ヒト型結核菌感染細胞を殺傷する方法において、前記のT細胞とヒト型結核菌感染細胞を接触させることができ、



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ストレスタンパク質複合体を含有する薬学的組成物であって、該複合体がhsp110又はgrp170ポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを含み、該免疫原性ポリペプチドが癌に関連している、薬学的組成物。

【請求項2】 免疫原性ポリペプチドがher-2/neuポリペプチドを含む、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項3】 her-2/neuポリペプチドが、her-2/neuの細胞内ドメインに由来する、請求項2記載の薬学的組成物。

【請求項4】 ストレスタンパク質複合体を含有する薬学的組成物であって、該複合体がhsp110又はgrp170ポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを含み、該免疫原性ポリペプチドがヒト型結核菌 (M. tuberculosis) 抗原を含んでいる、薬学的組成物。

【請求項5】 ヒト型結核菌抗原がMtb8.4又はMtb39である、請求項4記載の薬学的組成物。

【請求項6】 hsp110又はgrp170ポリペプチドが免疫原性ポリペプチドに複合されている、請求項1～5のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項7】 hsp110又はgrp170ポリペプチドが、非共有結合型相互作用により免疫原性ポリペプチドに複合されている、請求項6記載の薬学的組成物。

【請求項8】 複合体が融合タンパク質を含む、請求項1～5のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項9】 複合体が腫瘍に由来している、請求項1、2又は3記載の薬学的組成物。

【請求項10】 複合体がヒト型結核菌感染細胞に由来している、請求項4記載の薬学的組成物。

【請求項11】 ストレスタンパク質複合体が、hsp70、hsp90、grp78、及びgrp94ストレスタンパク質ファミリーの構成要員からなる群より選択されるポリペプチドをさらに含む、請求項1～10のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項12】 ストレスタンパク質複合体が、hsp70及びhsp25に複合されたhsp110を含む、請求項1～11のいずれか1項記載の薬学的組成物。

- 【請求項 13】 hsp110又はgrp170ポリペプチドをコードしている第1のポリヌクレオチド及び免疫原性ポリペプチドをコードしている第2のポリヌクレオチドを含み、該免疫原性ポリペプチドが癌に関連している、薬学的組成物。
- 【請求項 14】 hsp110又はgrp170ポリペプチドをコードしている第1のポリヌクレオチド及び免疫原性ポリペプチドをコードしている第2のポリヌクレオチドを含み、該免疫原性ポリペプチドがヒト型結核菌抗原を含む、薬学的組成物。
- 【請求項 15】 第1のポリヌクレオチドが第2のポリヌクレオチドに連結されている、請求項13又は14記載の薬学的組成物。
- 【請求項 16】 hsp110又はgrp170ポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを提示するように修飾された抗原提示細胞(APC)を含み、該免疫原性ポリペプチドが癌に関連している、薬学的組成物。
- 【請求項 17】 hsp110又はgrp170ポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを提示するように修飾された抗原提示細胞(APC)を含み、該免疫原性ポリペプチドがヒト型結核菌抗原を含む、薬学的組成物。
- 【請求項 18】 APCが樹状細胞又はマクロファージである、請求項16又は17記載の薬学的組成物。
- 【請求項 19】 APCがペプチド負荷により修飾されている、請求項16、17又は18記載の薬学的組成物。
- 【請求項 20】 APCが、hsp110又はgrp170ポリペプチドをコードしている第1のポリヌクレオチド及び免疫原性ポリペプチドをコードしている第2のポリヌクレオチドによるトランスフエクションにより修飾されている、請求項16、17又は18記載の薬学的組成物。
- 【請求項 21】 第1のポリヌクレオチドが第2のポリヌクレオチドに連結されている、請求項20記載の薬学的組成物。
- 【請求項 22】 複合体が、hsp110又はgrp170ポリペプチドと免疫原性ポリペプチドとの結合を増強するように加熱されている、請求項1～21のいずれか1項記載の薬学的組成物。
- 【請求項 23】 生理的に許容される担体をさらに含む、請求項1～22のい

ずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項24】 アジュバントをさらに含む、請求項1～23のいずれか1項記載の薬学的組成物。

【請求項25】 T細胞を抗原提示細胞(APC)と接触させる段階を含み、該APCがhsp110又はgrp170ポリペプチド及び腫瘍細胞に関連する免疫原性ポリペプチドとの接触により修飾されている、腫瘍細胞に対するT細胞を作製する方法。

【請求項26】 T細胞がCD4+又はCD8+ T細胞である、請求項25記載の方法。

【請求項27】 請求項24又は25記載の方法により作製されたT細胞。

【請求項28】 腫瘍細胞を殺傷するための組成物の調製のための、請求項27記載のT細胞の使用。

【請求項29】 T細胞を抗原提示細胞(APC)と接触させる段階を含み、該APCがhsp110又はgrp170ポリペプチド及びヒト型結核菌感染細胞に関連する免疫原性ポリペプチドとの接触により修飾されている、ヒト型結核菌感染細胞に対するT細胞を作製する方法。

【請求項30】 T細胞がCD4+又はCD8+ T細胞である、請求項29記載の方法。

【請求項31】 請求項29又は30記載の方法により作製されたT細胞。

【請求項32】 ヒト型結核菌感染細胞を殺傷するための組成物の調製のための、請求項31記載のT細胞の使用。

【請求項33】 被験者においてヒト型結核菌感染を阻害するための組成物の調製のための、請求項4～8、10～12、15又は17～24のいずれか1項記載の薬学的組成物の使用。

【請求項34】 被験者において腫瘍増殖を阻害するための組成物、被験者において癌の発症を阻害するための組成物、もしくは被験者において癌抗原に対する免疫応答を増強するための組成物の調製のための、請求項1～3、6～9、11～13、15～16又は18～24のいずれか1項記載の薬学的組成物の使用。

【請求項35】 請求項27記載のT細胞と生体試料を接触させる段階を含む、生体試料から腫瘍細胞を除去する方法。

【請求項36】 生体試料が血液又はその画分である、請求項35記載の方法

【請求項37】 ストレスタンパク質複合体を加熱する段階を含み、該ストレスタンパク質複合体が熱誘導性ストレスポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを含んでいる、ストレスタンパク質複合体の免疫原性を増強する方法。

【請求項38】 加熱段階がストレスタンパク質複合体を約39～40℃の温度に加熱する段階を含む、請求項37記載の方法。

【請求項39】 ストレスポリペプチドがhsp110又はhsp70を含む、請求項37又は38記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本明細書は、米国仮出願である1999年9月30日に出願された第60/156,821号、1999年11月2日に出願された第60/163,168号、及び2000年6月30日に出願された第60/215,497号の恩典を請求するものであり、それら各々の内容全体が本明細書に参照として組入れられている。本明細書を通じて、様々な文献が参照される。これらの文献の内容は、本発明が属する技術分野の状況をより十分に説明するため、その全体が本明細書に参照として組入れられている。

【0002】

本明細書に開示された発明は、米国の国立衛生研究所(NIH)の基金第GM 45994号の支援の下で行われた研究の一環である。米政府は、本発明に対し一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は概して、癌及び感染症の予防及び治療に関する。本発明はより詳細に述べると、免疫原性ポリペプチドに複合された、熱ショックタンパク質110(hsp110)又はグルコース調節タンパク質170(grp170)のようなストレスタンパク質の少なくとも一部を含むポリペプチド、並びにこのようなストレスタンパク質及び免疫原性ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに加え、ストレスタンパク質及び免疫原性ポリペプチドを提示する抗原提示細胞に関する。このようなポリペプチド、ポリヌクレオチド及び抗原提示細胞は、癌及び感染症の予防及び治療のためのワクチン及び薬学的組成物において使用することができる。本発明は更に、加熱などによるストレスタンパク質複合体の効力の増強に関する。

【0004】

発明の背景

癌及び感染症は、世界中で重大な健康上の問題である。これらの疾患の検出及び治療において進展が見られるが、予防又は治療のためのワクチンもしくは他の万能の方法は現時点で利用することができない。一般に化学療法又は手術及び放射線療法の組合せを基にした現在の療法は、多くの患者において不適切であるこ

とが証明され続けている。

【 0 0 0 5 】

例えば、原発性乳癌は、外科的切除により効率良く治療されることが多い。しかし更に疾患が再発した場合、追加療法の選択肢には制限があり、かつ全身疾患の治療の効果的手段はない。自家腫瘍に対する免疫応答が認められるものの、これらは疾患の管理には効力がない。更なる抗腫瘍反応を刺激するための努力が、ワクチンに有用な腫瘍抗原の同定に向けられている。これに関連する方法は、熱ショックタンパク質、例えばhsp70の雑多なペプチド結合特性を利用している。これらの分子シャペロンは、ペプチドに結合し、かつ多くのタンパク質フォールディング、輸送及び集成法に関連し、かつMHC複合体の抗原提示経路に関連している可能性がある。

【 0 0 0 6 】

哺乳類細胞の熱ショックタンパク質は、関連するタンパク質の配列のいくつかのファミリーに分類することができる。タンパク質発現レベルにした主な哺乳類hspは、質量(およそ)25kDa(hsp25)、70kDa(hsp70)、90kDa(hsp90)及び110kDa(hsp110)である細胞質/核タンパク質である。しかしhspに加え、ストレスタンパク質の第2のセットは、小胞体(ER)に局在している。これらのストレスタンパク質の誘導は、hspのように高温ストレスに容易に反応しないが、ERの機能を妨害するようなストレス(例えば、グルコース飢餓及びグリコシル化の阻害、無酸素状態、及び還元状態、又はカルシウムホメオスタシスを妨害する特定の物質)により調節される。これらのストレスタンパク質は、グルコース調節タンパク質(grps)と称される。主なgrpsは、発現を基に、近似サイズ78kDa(grp78)、94kDa(grp94)、及び170kDa(grp170)を有する。grp78は、細胞質hsp70と相同性を有し、一方grp94はhsp90と相同性を有する。

【 0 0 0 7 】

数年来個々のストレスタンパク質について研究されているが(例えばhsp70のように、場合によっては集散的に研究されている)、前述のhsp及びgrp群の最大である、hsp110及びgrp170はほとんど注目されていない。両者とも、配列解析により、hsp70ファミリーの巨大かつ高度に多様な関係物を示していることがわかつ

た。hsp70フアミリー、hsp110フアミリー、及びgrp170フアミリーは、共通の進化の起源を共有している真核細胞の3種の識別可能なストレスタンパク質群を含むことが認められた。(明らかに)全ての真核細胞の細胞質中のhsp70に平行したhsp110の存在及びER中のgrp78に平行したgrp170の存在は、これらの疎遠な関係のタンパク質フアミリーの重要な他と異なる機能について議論がある。しかし全てのストレスタンパク質が、ワクチンとして機能するわけではなく、かつ異なるものは異なる活性を示すであらうと予想することができる。

【 0 0 0 8 】

感染症及び癌の療法に関する膨大な研究にもかかわらず、これらの疾患は効率的診断及び治療に困難を留めている。従って、当技術分野において、癌及び感染症を治療するための改善された方法が必要である。本発明は、これらの必要性を満たし、かつ更にその他の関連した利点を提供するものである。

【 0 0 0 9 】

発明の概要

本発明は、ストレスタンパク質複合体を含有する薬学的組成物を提供する。このストレスタンパク質複合体は、hsp110又はgrp170ポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを含む。一部の態様において、hsp110又はgrp170ポリペプチドは、例えば非共有結合型相互作用によるか又は共有結合型相互作用により、免疫原性ポリペプチドと複合され、これは融合タンパク質を含む。一部の態様において、この複合体は腫瘍に由来している。別の態様において、この複合体は感染性物質に感染した細胞に由来している。ストレスタンパク質複合体の免疫原性ポリペプチドは、癌又は感染症に関連することができる。本発明のストレスタンパク質複合体は更に、hsp70、hsp90、grp78及びgrp94ストレスタンパク質フアミリーの構成要員を含む、追加のストレスポリペプチドを含むことができる。ある態様において、このストレスタンパク質複合体は、hsp70及び／又はhsp25に複合されたhsp110を含む。

【 0 0 1 0 】

本発明は更に、hsp110又はgrp170ポリペプチドをコードしている第1のポリヌクレオチド及び免疫原性ポリペプチドをコードしている第2のポリヌクレオチド

を含有する薬学的組成物を提供する。第一及び第2のポリペプチドに関連していはる一部の態様において、第1のポリヌクレオチドは、第2のポリヌクレオチドに連結されている。本発明の薬学的組成物は更に、生理的に許容される担体及び／又はアジュバントを含有することができる。効力のある薬学的組成物は更に、GM-CSF-分泌細胞も含む。あるいは、GM-CSF-分泌細胞は、薬学的組成物の投与前、投与中又は投与後に投与することにより、本発明の薬学的組成物と同時投与することとができる。GM-CSF-分泌細胞の使用は、薬学的組成物の効力を増大する。

【 0 0 1 1 】

一部の態様において、前述の複合体は、腫瘍から又は感染性物質により感染した細胞から精製される。このような態様において、精製されたストレスポリペプチドは、1種以上の免疫原性ポリペプチドと複合される。ストレスポリペプチドの免疫原性ポリペプチドへの結合は、ストレス、例えば熱への曝露、無酸素状態及び／又は虚血状態、もしくはタンパク毒素によるストレスなどにより、変更及び／又は増強することができる。特に、本発明のストレスタンパク質複合体は、免疫原性ポリペプチドと複合されたストレスポリペプチドを含むことができ、ここでこの複合体は加熱されている。このような加熱は、特にストレスポリペプチドが熱誘導ストレスタンパク質を含む場合に、ストレスタンパク質複合体のワクチンとしての効力を増強する。熱誘導性ストレスタンパク質の例は、hsp70及びhsp110を含むが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 1 2 】

一部の態様において、免疫原性ポリペプチドが公知である。免疫原性ポリペプチドが公知の分子である場合、この免疫原性ポリペプチドは、ストレスポリペプチドとの混合物として、又はストレスポリペプチドとの複合体として提供するることができる。hsp110又はgrp170ポリペプチドは、免疫原性ポリペプチドと、非共有結合により複合され得る。あるいは、この複合体は、融合タンパク質を含むことができる。ここでこのストレスポリペプチドは、免疫原性ポリペプチドに連結されている。免疫原性ポリペプチドの例は、癌又は感染症に関連する抗原、例えば乳癌抗原her2/neu又はヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 抗原Mtb8.4及びMtb39などを含むが、これらに限定されるものではない。免疫原性ポリペプ

チドが不明である場合、これは癌又は感染症の被験者の組織からのストレスポリペプチドの精製に不随して得ることができる。

【 0 0 1 3 】

同じくhsp110又はgrp170ポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを提示するよう修飾された抗原提示細胞(APC)を含有する薬学的組成物も提供される。あるいは、APCは、癌細胞及び感染性物質に感染した細胞を含む疾患細胞からのhsp110又はgrp170の精製により得られた免疫原性ポリペプチドを提示するよう修飾することができる。好ましくは、APCは、樹状細胞又はマクロファージである。APCは、ペプチド負荷及び免疫原性ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドによるトランスフェクションを含むが、これらに限定されるものではない様々な手段により修飾することができる。

【 0 0 1 4 】

本発明の薬学的組成物は、被験者に投与することができ、これによりヒト型結核菌感染症を阻害し、腫瘍増殖を阻害し、癌の発症を阻害し、及び癌又は感染症を治療又は予防する方法が提供される。

【 0 0 1 5 】

更に本発明は、腫瘍細胞に対するT細胞を産生する方法を提供する。この方法は、T細胞を抗原提示細胞(APC)と接触させる段階を含み、ここでAPCは、hsp110又はgrp170ポリペプチド及び腫瘍細胞に関連する免疫原性ポリペプチドを提示するよう修飾される。このようなT細胞は、腫瘍細胞死滅の方法において使用するこゝとができ、ここで腫瘍細胞はT細胞と接触される。同様に本発明は、ヒト型結核菌感染細胞に対するT細胞を産生する方法を提供し、ここでT細胞は、hsp110又はgrp170ポリペプチド及びヒト型結核菌感染細胞に関連する免疫原性ポリペプチドを提示するよう修飾されたAPCと接触される。本発明は、本方法により産生されたT細胞、並びにこのようなT細胞を含有する薬学的組成物を含む。T細胞は、ヒト型結核菌感染細胞を死滅する方法において、ヒト型結核菌感染細胞と接触させることができる。T細胞は、CD4+又はCD8+であることができる。

【 0 0 1 6 】

本発明は更に、生体試料から腫瘍細胞を除去する方法を提供する。この方法は

、生体試料を、本発明のT細胞と接触させる段階を含む。好ましい態様において、生体試料は、血液又はその画分である。更に、被験者において腫瘍増殖を阻害する方法も提供される。この方法は、抗原提示細胞(APC)を伴う被験者から単離されたCD4+及び／又はCD8+ T細胞をインキュベーションする段階を含み、ここでAPCは、hsp110又はgrp170ポリペプチド及び腫瘍細胞に関連する免疫原性ポリペプチドを提示するよう修飾され、T細胞を増殖する。この方法は更に、有効量の増殖したT細胞を被験者に投与し、これにより被験者における腫瘍増殖を阻害することを含む。別の態様において、被験者における腫瘍増殖を阻害する方法は、抗原提示細胞(APC)を有する被験者から単離されたCD4+及び／又はCD8+ T細胞をインキュベーションする段階、ここでAPCは、hsp110又はgrp170ポリペプチド及び腫瘍細胞に関連する免疫原性ポリペプチドを提示するよう修飾され、T細胞を増殖し、少なくとも1種の増殖した細胞をクローニングし、かつクローニングされたT細胞を有効量患者に投与し、これにより被験者における腫瘍増殖を阻害することを含む。

【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、ストレスタンパク質hsp110及びgrp170は、腫瘍抗原と複合された場合に、抗腫瘍ワクチンとして著しく有効であるという発見を基にしている。これらのストレスタンパク質複合体の効力は、予防的状況及び治療的状況の両方において明らかにされている。これらのストレスタンパク質の効果的免疫応答を促進する能力の発見は、癌及び感染症の予防及び治療における使用のための様々な抗原の提示におけるそれらの用途の基本を提供している。Hsp110及びgrp170は両方とも拡大された(enlarged)ペプチド結合クレフト(peptide binding cleft)を有し、かつhsp70と比べより効果的に伸びた(unfolded)ペプチド鎖を安定化することのできるもので、これらの分子は、先に得られたものとは異なる免疫学的反応を誘起することができる。

【 0 0 1 8 】

ストレスタンパク質hsp110及びgrp170の概略

ほとんどの細胞タンパク質の発現は、突然の温度上昇に曝された哺乳類細胞に

おいて顕著に低下されるが、熱ショックタンパク質は、これらの条件下で発現増加を示す。様々なストレッチャーに反応して生じた熱ショックタンパク質は、天然の状態(例えば、熱又は塩化グアニジン処理により)で他のタンパク質に結合する能力を有し、特にリボソームから遊離するか又は小胞体から押出されているような新生ペプチドに結合する能力を有する(Hendrick及びHartl, Ann. Rev. Biochem., 62:349-384(1993); Hartl, Nature, 381:571-580(1996))。熱ショックタンパク質は更に、細胞質、小胞体及びミトコンドリア内のタンパク質の適切なフォールディング及び集成における重要な役割を意味するシヤペロン機能に役立つことも示されている(Frydmanら、Nature, 370:111-117(1994))。

【 0 0 1 9 】

哺乳類の熱ショックタンパク質ファミリーは、hsp28、hsp70、hsp90及びhsp110を含む。これらの主な熱ショックタンパク質は、細胞質において発見されており、かつより少ない量が核において発見されている。ストレスタンパク質の別のセットで、グルコース調節タンパク質(grp)として知られているものは、小胞体中に存在する。グルコース調節タンパク質の主要ファミリーは、grp78、grp74、grp170を含む。この範疇のストレスタンパク質は、それらのプロモーター中に、熱ショック要素を欠いており、かつ熱により誘導されないが、他のストレス条件、例えば無酸素症などにより誘導される。

【 0 0 2 0 】

Hsp110は、豊富かつ強力な誘導可能な哺乳類の熱ショックタンパク質である。ヒトhsp110は、KIAA0201、NY-CO-25、HSP105 α 及びHSP105 β としても公知である。マウスのhsp110も、HSP105 α 、HSP105 β 、42℃特異性熱ショックタンパク質、及びhsp-E71として公知である。Hsp110は、hsp70と比べてより大きいサイズ及び異なる結合親和性を有するペプチドに結合することが可能な、ATP結合 β シート領域及び α ヘリックス領域を有する。Hsp110は、より短いペプチド(12mer)に結合すること示されており、かつhsp110への結合のための好ましいコンセンサスモチーフが決定されている(すなわち、塩基性、極性、芳香族性/塩基性、プロリン、塩基性、酸性、芳香族性、芳香族性、塩基性、芳香族性、プロリン、塩基性、X(優先的でない)、塩基性/芳香族性)。この配列は、hsp70ファミリーの構成

要員に結合するために先に同定された好ましい配列モチーフとは異なる。

【 0 0 2 1 】

Hsp110は、hsp70と比べて、より効果的に熱変性されたタンパク質を安定化し、これは等モルベースで4倍以上の効率である。Hsp70及びhsp110のペプチド結合特性は、これらを、変性したペプチド鎖への結合により変性したタンパク質が凝集することを阻害する上で効果的なものになっている。熱及び塩化グアニジン曝露の2種の異なる変性条件を用いると、hsp110は、ルシフェラーゼ及びクエン酸シンターゼが1:1のモル比で存在する場合のこれらの凝集の阻害において、ほとんど全ての効力を示している。Hsp70ファミリーの構成要員は、同様の機能を発揮するが、顕著に低い効率である。

【 0 0 2 2 】

Grp170は、小胞体中存在するhsp110に対する強力な構造ホモログである(Linら、Mol. Biol. Cell、4:1109-19(1993); Chenら、FEBS Lett、380:68-72(1996))。Grp170は、hsp110と同じ二次構造の特徴を示し、これは拡大されたペプチド結合ドメインを含む。Grp170は、その中心近傍にβシートドメインを、よりC末端側にα-ヘリックスドメインを、及び両方に連結しているhsp110に存在するループドメインよりもはるかに長いループドメイン(アミノ酸長200個対アミノ酸長100個)を含み、かつDnakは存在しないことが予想される。加えて、grp170は恐らくタンパク質の哺乳類小胞体への輸送に必要な重要なATPaseである(Dierksら、EMBO J.、15:6931-42(1996))。Grp170は、ORP150(ヒト及びラットの両方で同定された酸素-調節タンパク質)及びCBP-140(マウスにおいて同定されたカルシウム結合タンパク質)としても公知である。Grp170は更に、hsp70よりも、変性タンパク質をより効率的に安定化することが示されている。

【 0 0 2 3 】

ワクチンとしてgrp170及びhsp110の両方が機能するという本明細書に記された発見は、これまで利用できる戦略よりも、癌及び感染症の治療及び予防における使用のための、新規及びより効果的なワクチンの可能性を提供する。

【 0 0 2 4 】

定義

本明細書において使用された全ての科学用語及び技術用語は、特に記さない限りは、当技術分野において通常使用される意味を有する。本明細書において使用される場合に、下記の単語及び句は、特定の意味を有する。

【0025】

本明細書で使用される「ポリペプチド」とは、天然の給源から単離された、組換え技術により作出された又は化学的に合成されたかに関わらず、タンパク質、タンパク質断片、及びペプチドを含む。本発明のポリペプチドは典型的には、少なくとも約6個のアミノ酸を含む。

【0026】

本明細書で使用される「ベクター」とは、対象となる1種以上の遺伝子又は配列を宿主細胞へ送達し、かつ好ましくは発現することが可能である、構築物を意味する。ベクターの例は、ウィルスベクター、裸のDNA又はRNA発現ベクター、プラスミド、コスミド又はファージベクター、カチオン性縮合剤に会合されたDNA又はRNAの発現ベクター、リポソームに封入されたDNA又はRNA発現ベクター、及びある種の真核細胞、例えばプロデュース細胞を含むが、これらに限定されるものではない。

【0027】

本明細書で使用される「発現調節配列」とは、核酸の転写を指示する核酸配列を意味する。発現調節配列は、構成的又は誘導性プロモーターのようなプロモーター、又はエンハンサーであることができる。発現調節配列は転写される核酸配列に機能的に連結される。

【0028】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、1本鎖又は2本鎖の形状のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを意味し、かつ特に記さない限りは、核酸に天然のヌクレオチドと同様の方法でハイブリダイズする天然のヌクレオチドの公知の類似体を包含している。

【0029】

本明細書において使用される「抗原提示細胞」又は「APC」とは、抗原の操作及びリンパ球への提示が可能な細胞を意味する。APCの例は、マクロファージ、

ランゲルハンス-樹状細胞、濾胞性樹状細胞、B細胞、単球、繊維芽細胞、及び繊維細胞を含むが、これらに限定されるものではない。樹状細胞は、抗原提示細胞の好ましい型である。樹状細胞は、多くの非リンパ系組織において発見されているが、輸入リンパ又は血流を介してリンパ系臓器のT細胞-依存領域へ移動することができる。非リンパ系臓器において、樹状細胞は、ランゲルハンス細胞及び間質性樹状細胞を含む。リンパ及び血液において、これらは各々、輸入リンパ中のベール細胞及び血液樹状細胞を含む。リンパ系臓器において、これらはリンパ系樹状細胞及び指状嵌入細胞を含む。

【 0 0 3 0 】

本明細書において使用されるエピトープを提示するように「修飾された」とは、天然又は組換え法によりエピトープを提示するように操作される抗原提示細胞(APC)を意味する。例えば、APCは、ペプチド負荷の、単独又は混合物の一部としての、単離された抗原への曝露により、もしくは1種以上のエピトープを含むペプチドを発現するためのAPCの遺伝的修飾により、修飾することができる。

【 0 0 3 1 】

本明細書において使用される「腫瘍タンパク質」とは、腫瘍細胞により発現されるタンパク質である。腫瘍タンパク質であるタンパク質は、免疫アッセイ法(ELISAなど)において、癌患者由来の抗血清と、検出できるように反応することもある。

【 0 0 3 2 】

本明細書において使用される「熱誘導性ストレスポリペプチド」とは、上昇した温度によりその発現が誘導されるようなストレスポリペプチド又はタンパク質を意味する。熱誘導性ストレスポリペプチドの一例は、そのプロモーター内に1種以上の熱ショックエレメントを含むストレスタンパク質を含む。

【 0 0 3 3 】

本明細書において「免疫原性ポリペプチド」とは、B細胞及び/又はT細胞表面抗原受容体により認識される(すなわち特異的に結合される)タンパク質の一部である。このような免疫原性ポリペプチドは、一般に癌又は感染症に関連するタンパク質の少なくとも5個のアミノ酸残基を含み、より好ましくは少なくとも10

個の、及び更により好ましくは少なくとも20個のアミノ酸残基を含む。ある好ましい免疫原性ポリペプチドは、N末端リダー配列及び／又は膜貫通ドメインが欠失しているようなペプチドを含む。他の好ましい免疫原性ポリペプチドは、成熟タンパク質に比べ、小さいN末端及び／又はC末端欠失(例えば、1～30個のアミノ酸、好ましくは5～15個のアミノ酸)を含むことがある。

【 0 0 3 4 】

本明細書において使用される「薬学的に許容される担体」とは、活性成分と組合わせた場合に、成分の生物学的活性を保持しかつ被験者の免疫系と反応しないような物質のいずれかを含む。例として、標準の薬学的担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水など、油/水乳剤のような乳剤、及び様々な種類の湿潤剤があるが、これらに限定されるものではない。エアゾール及び非経口投与のための好ましい希釈剤は、リン酸緩衝生理食塩水又は通常の(0.9%)生理食塩水である。

【 0 0 3 5 】

このような担体を含む組成物は、周知の従来の方法により製剤される(例えば、レミントン (Remington) 「薬科学 (Pharmaceutical Science)」、第43章、14版、Mack Publishing社、イーストン、PA、18042、USAを参照のこと)。

【 0 0 3 6 】

本明細書において使用される「アジュバント」とは、免疫応答を促進するために当技術分野において通常使用されるアジュバントを含む。アジュバントの例は、ヘルパーペプチド；アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウムゲル(アルム)又はリン酸アルミニウムなど；フロイントの不完全アジュバント及び完全アジュバント(Difco Laboratories社、デトロイト、MI)；メルクアジュバント65(Merck社、ローウエイ、NJ)；AS-2(Smith-Kline Beecham社)；QS-21(Aquilla Biopharmaceutical社)；MPL又は3d-MPL(Corixa社、ハミルトン、MT)；LEIF；カルシウム、鉄、又は亜鉛の塩；アシル化されたチロシンの不溶性懸濁液；アシル化された糖質；カチオン性又はアニオン性誘導された多糖；ポリホスファゼン；生分解性ミクロスフェア；モノホスホリリピドA及びクイラルA；ムラミトリペプチドホスファチジルエタノールアミン、又はサイトカインを含む免疫賦活複合体(例えば、GM-CSF又はインターロイキン-2、-7もしくは-12)、及び免疫賦活性DNA配列

である。一部の態様において、ポリヌクレオチドワクチンの使用同様、ヘルパーペプチド又はサイトカインのようなアジュバントが、アジュバントをコードしているポリヌクレオチドを介して提供され得る。

【 0 0 3 7 】

本明細書において「1つの(a)」又は「1つの(an)」とは、特に明確に指示しない限りは、少なくとも1個を意味する。

【 0 0 3 8 】

本発明のポリヌクレオチド

本発明は、hsp110又はgp170のような1種以上のストレスタンパク質、又はそれらの一部もしくは他の変種をコードしている第1のポリヌクレオチド、並びに1種以上の免疫原性ポリペプチド、又はそれらの一部もしくは他の変種をコードしている第2のポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドを提供する。一部の態様において、これらの第一及び第2のポリヌクレオチドは連結され、ストレスタンパク質複合体をコードしている単独のポリヌクレオチドを形成する。この単独のポリヌクレオチドは、様々な方法で第一及び第2のタンパク質を発現することができ、例えば、単独の融合タンパク質として又は複合体を形成することが可能であるような2種の個別のタンパク質としてである。

【 0 0 3 9 】

好ましいポリヌクレオチドは、ストレスタンパク質又は免疫原性ポリペプチドの一部をコードしている、少なくとも15個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30個の連続ヌクレオチド、及びより好ましくは少なくとも45個の連続ヌクレオチドを含む。より好ましくは、第1のポリヌクレオチドは、ストレスタンパク質のペプチド結合部分をコードし、かつ第2のポリヌクレオチドは、免疫原性ポリペプチドの免疫原性部分をコードしている。このような配列のいずれかに相補的であるポリヌクレオチドも、本発明に包含される。ポリヌクレオチドは、1本鎖(コード又はアンチセンス)もしくは2本鎖であることができ、かつDNA(ゲノム、cDNA又は合成)又はRNA分子であることができる。RNA分子は、イントロンを含みかつ1対1の方法でDNA分子に対応しているようなHnRNA分子、並びにイントロンを含まないmRNA分子を含む。追加のコード又は非コード配列は、本発明のポリ

ヌクレオチド内に存在することができ、必ずしもではなく、かつポリヌクレオチドは、他の分子及び／又は支持物質に連結することができるが、必ずしもではない。

【 0 0 4 0 】

ポリヌクレオチドは、天然の配列(すなわち、ストレスタンパク質、免疫原性ポリペプチド又はそれらの一部をコードしている内因性配列)を含むことができ、もしくはこのような配列の変種を含むことができる。ポリヌクレオチド変種は、1個以上の置換、付加、欠失及び／又は挿入を含み、その結果コードされたポリペプチドの免疫原性が、天然のストレスタンパク質に比して減弱されることはない。コードされたポリペプチドの免疫原性に対する作用は、一般に本明細書に記載されたように評価することができる。変種は、天然のストレスタンパク質又はその一部をコードしているポリヌクレオチド配列に対して、好ましくは少なくとも約70%の同一性を、より好ましくは少なくとも約80%の同一性を及び最も好ましくは少なくとも約90%の同一性を示す。

【 0 0 4 1 】

2種のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列は、以下に説明するように対応が最大になるように並べた場合に、これら2種の配列の中のヌクレオチド又はアミノ酸配列が同じである場合に、「同一」であると称される。2個の配列間の比較は、典型的には、配列類似性の局部領域を同定しかつ比較するための比較ウィンドウに広がる配列の比較により行われる。本明細書において使用された「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20個の、通常は30〜約75個の、40〜約50個の連続位置のセグメントを意味し、ここで配列は、2個の配列が最適に並べられた後、同じ番号の連続位置の参照配列と比較され得る。

【 0 0 4 2 】

比較のための最適な配列アライメントは、Lasergeneの生体情報学統合ソフトウェア(IDNASTAR社、マジソン、WI)において、Megalignプログラムを用い、デフォルトのパラメータで行うことができる。このプログラムは、下記の参考文献において説明された、いくつかのアライメント方式を具体化している: Dayhof, M.O., (1978), 「タンパク質の進化的変化モデル-遠縁の検出マトリックス」

; Dayhoff, M.O. (編集)、タンパク質配列及び構造のアトラス、National Biomedical Research Foundation、ワシントンDC、第5巻補遺3、345-358頁; Hein J.、(1990)、「アラインメント及び系統学のための統一法」、626-645頁、Methods in Enzymology、第183巻、Academic Press社、サンディエゴ、CA; Higgins, D.G. 及び Sharp, P.M.、(1989)、CABIOS、5:151-153; Myers, E.W. 及び Muller W.、(1988)、CABIOS、4:11-17; Robinson, E.D. (1971)、Comb. Theor.、11:105; Santou, N.、Nes, M.、(1987)、Mol. Biol. Evol.、4:406-425; Sneath, P.H.A. 及び Sokal, R.R.、(1973)、Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy、Freeman Press、サンフランシスコ、CA; Wilbur, W.J. 及び Lipman D.J. (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80:726-730)。

【 0 0 4 3 】

好ましくは、「配列同一性の割合(%)」は、2個の最適に並べた配列を少なくとも20位の比較ウィンドウについて比較することにより決定することができ、ここで比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列の一部は、これから2個の配列の最適アラインメントにおいて、参照配列(これは付加又は欠失を含まないう)と比較して、20%以下、通常5~15%、又は10~12%の付加又は欠失(すなわちギャップ)を含むことができる。この割合は、合致した位置の数を得るために、両方の配列において同じ核酸塩基又はアミノ酸残基が生じるような位置の数を決定し、合致した位置の数を参照配列の位置の総数(すなわちウィンドウサイズ)で割り、かつこの結果に100を掛け、配列同一性のパーセントを得ることにより算出される。

【 0 0 4 4 】

変種は更に、又はあるいは、天然の遺伝子、又はそれらの一部もしくは相補体と実質的に相同であることができる。このようなポリヌクレオチド変種は、天然のストレスタンパク質をコードしている天然のDNA配列(又は相補配列)に生じる中程度のストリンジエント条件下で、ハイブリダイズすることが可能である。適当な中程度のストリンジエントな条件は、5XSSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH8.0)の溶液中での予備洗浄; 50~65℃での、5XSSC、一晚のハイブリダイゼーション; それに続く、各々、0.1% SDSを含むする、2X、0.5X及び0.2X SSCによる、65℃

、20分間の洗浄2回を含む。

【 0 0 4 5 】

当業者には、遺伝暗号の縮重の結果として、本明細書に記されたポリペプチドをコードしている多くのヌクレオチド配列が存在することは理解されると思われる。このようなポリヌクレオチドの一部は、天然の遺伝子のヌクレオチド配列に對して最小の相同性を生じる。しかしながら、コドン用法の差異のために變動するポリヌクレオチドは、本発明により具体的に考慮されている。更に本明細書に提供されたポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、ヌクレオチドの欠失、付加及び又は置換などの、1種以上の變異の結果變動する内因性遺伝子である。得られるmRNA及びタンパク質は、變更された構造又は機能を有するが、必ずしもではない。対立遺伝子は、標準技術を用いて同定することができる(例えば、ハイブリダイゼーション、増幅及び/又はデータベースの配列比較)。

【 0 0 4 6 】

ポリヌクレオチドは、当技術分野において公知の様々な技術のいずれかを用いて調製することができる。ストレスタンパク質をコードしているDNAは、ストレスタンパク質mRNAを発現している組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒトhsp110又はgrp170 DNAは、ヒト組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に得ることができる。ストレスタンパク質-コードしている遺伝子も、ゲノムライブラリー又はオリゴヌクレオチド合成から得ることができる。ライブラリーは、対象となる遺伝子又はそれによりコードされたタンパク質を同定するためにデザインされたプローブ(例えば、ストレスタンパク質に對する抗体又は少なくとも約20～80塩基のオリゴヌクレオチドなど)でスクリーニングすることができる。具体的なライブラリーは、ヒト肝cDNAライブラリー(ヒト肝5'伸長+cDNA、Clontech Laboratories社)及びマウス腎cDNAライブラリー(マウス腎5'-伸長cDNA、Clontech laboratories社)を含む。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることは、Sambrookらの著書(Molecular Cloning: A Laboratory Manual (二エーヨーク、Cold Spring Harbor Laboratory Press社、1989))に記された方法のような、常法を用いて

行うことができる。hap110又はgrp170をコードしている遺伝子を単離する別の手段を、PCR法に使用することができる(Sambrookら、前掲; Dieffenbachら、PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press社、1995)。

【 0 0 4 7 】

プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さ及び偽陽性を最小にするために十分に曖昧でないものでなければならぬ。オリゴヌクレオチドは好ましくは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAへのハイブリダイゼーション時に検出することができるように標識される。標識法は、当技術分野において周知であり、かつ³²P-標識されたATPのような放射標識、ピオチン化又は酵素標識の使用を含む。中等度のストリンジェンシー及び高いストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、Sambrookらの著書(前掲)に提供されている。

【 0 0 4 8 】

このようなライブラリーヌクレオチド配列は、寄託された別の公知の配列及びGenBank又は他のプライベータ配列データベースのような公開されたデータベースで入手することができる配列と比較されかつ並べることができる。分子の限定された領域内又は完全長配列に及ぶ配列同一性(アミノ酸又はヌクレオチドのいずれかのレベル)は、相同性を測定するために様々なアルゴリズムを使用する、コンピュータソフトウェアプログラムを用いる配列アライメントを通じて決定することができる。

【 0 0 4 9 】

タンパク質コード配列を有する核酸分子は、選択されたcDNAライブラリー又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、かつ必要ならば、Sambrookら(前掲)に記された通常のプライマー伸長法を用い、cDNAに逆転写されていないmRNAの前駆体及びプロセシング中間体を検出することにより得ることができる。

【 0 0 5 0 】

ポリヌクレオチド変種は一般に、例えば固相ホスホロアミダイト化学合成など

による化学合成を含む当技術分野において公知のいずれかの方法により調製することができる。更にポリヌクレオチド配列の修飾は、オリゴヌクレオチド位置指定突然変異誘発のような、標準の突然変異誘発技術を用いて導入することもできる(Adelmanら、DNA、2:183(1983)を参照)。あるいは、DNAが適当なRNAポリメラゼプロモーター(T7又はSP6など)と共にベクターに組み入れられているならば、RNA分子は、ストレスタンパク質又はその一部をコードしているDNA配列のインデントロ又はインビボ転写により作製することができる。ある種のタンパク質は、本明細書に記されたような、コードされたポリペプチドを調製するため使用する。ことができて、加えて、あるいは代わりにより一部を患者に投与することができる、その結果そのコードされたポリペプチドがインビボにおいて作出される(例えば、ストレスポリペプチドコードしているcDNA構築物による、樹状細胞のような抗原提示細胞のトランスフェクション、及びトランスフェクションされた細胞の患者への投与)。

【 0 0 5 1 】

ポリヌクレオチドを、インビボにおける安定性を増大するように更に修飾してもよい。可能性のある修飾は、5'及び/又は3'末端へのフランキング配列の付加；主鎖におけるホスホエステル結合(phosphodiesterase linkage)の代わりのホスホロチオエート又は2'-O-メチルの使用；及び/又は、イノシン、クエオシン(queosin)、及びウイプトシン(wybutosin)のような従来型でない塩基に加え、アデニン、シチジン、グアニン、チミジン及びウリジンのアセチル-、メチル-、チオ-及びその他の修飾された形の封入を含むが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 5 2 】

ヌクレオチド配列は、確立された組換えDNA技術を用いて、様々な他のヌクレオチド配列と一緒にすることができる。例えば、ポリヌクレオチドは、プラスミド、ファージミド、ラムダファージ誘導体及びコスミドを含む、様々なクロニングベクターのいずれかにクロニングすることができる。特に対象となるベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プロンプト製ベクター及びシークエンシングベクターを含む。概して、ベクターは、少なくとも1種の生物において機能

する複製起点、都合の良い制限エンドヌクレアアーゼ切断部位及び1個以上の選択マーカーを含む。他のエレメントは、望ましい用途によって決まり、かつ当業者には自明のことであると思われる。

【 0 0 5 3 】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、哺乳類細胞への導入を可能にし、かつそこでの発現を可能にするように製剤することができる。このような製剤は、特に下記に記すような治療目的に有用である。当業者は、標的細胞におけるポリヌクレオチドの発現を実現するには多くの方法があり、かついずれか適当な方法を用いることができることを理解すると思われる。例えば、ポリヌクレオチドは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、又はワクシニアウイルスもしくは他のポックスウイルス(例えば、トリポックスウイルス)などがあるが、これらに限定されるものではないようなウイルスベクターに組込むことができる。DNAのこのようなベクターへの導入技術は、当業者には周知である。レトロウイルスベクターは更に、遺伝子に、選択マーカー(形質導入された細胞の同定又は選択を補助するため)及び/又はベクターを標的特異性にするための特定の標的細胞上の受容体のリガンドをコードしている遺伝子のような標的部位を、導入又は組込むことができる。標的化は、当業者に公知の方法により抗体を用いて実現することもできる。

【 0 0 5 4 】

治療目的の他の製剤は、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、並びに水中油型乳剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む脂質ベースのシステムのような、コロイド分散システムを含む。インビトロ及びインビボ送達ビヒクルとしての用途に好ましいコロイドシステムは、リポソーム(すなわち、人工膜小胞)である。このようなシステムの調製及び使用は、当技術分野において周知である。

【 0 0 5 5 】

ストレスポリペプチド及び免疫原性ポリペプチド

本発明の状況において、ストレスポリペプチド及びストレスタンパク質は、少なくともhsp110及び/又はgrp170タンパク質及び/又はそれらの変種のペプチド

結合部分を含む。本明細書に記されたようなポリペプチドは、いかなる長さであつてもよい。天然のタンパク質及び／又は異種配列由来の追加の配列が存在することができ、かつこのような配列は、更なるペプチド結合、免疫原性又は抗原性特性を有するが、必ずしもではない。一部の態様において、ストレスポリペプチドは更に、hsp70、hsp90、grp78及びgrp94ストレスタンパク質ファミリーの構成要員の全て又は一部を含む。

【 0 0 5 6 】

Hsp110のシャペロン化活性及びペプチド結合活性を媒介することが可能であるようなhsp110の機能ドメイン及び変種は、Oh, HJらにより(J. Biol. Chem., 274(22):15712-18(1999))同定されている。Grp170の機能ドメインは、hsp110のものに相似している。本明細書に記されたストレスポリペプチドの候補断片及び変種は、熱-変性されたルシフェラーゼを可溶化しかつウサギの網状赤血球溶解物の存在下でルシフェラーゼを再生(refold)するそれらの能力を評価することにより、シャペロン化活性を有することを確定することができる(Ohら、前掲)。

【 0 0 5 7 】

いくつかの態様において、免疫原性ポリペプチドは、癌又は前癌状態に関連している。癌に関連する免疫原性ポリペプチドの一例は、her-2/neuペプチドである(Bargmannら、Nature, 319(6050):226-30(1986); Bargmannら、Cell, 45(5):649-57(1986))。her-2/neuペプチドの例は、her-2/neuの細胞内ドメイン(アミノ酸残基676-1255; Bargmannら、前記文献参照)、her-2/neuの細胞外ドメインのp369(E75としても公知；

KIFGSLAFL (配列番号：6)

)、及びher-2/neuの膜貫通領域のp546(

VLQGLPREYV (配列番号：5)

)を含むがこれらに限定されるものではない。別の態様において、免疫原性ポリペプチドは、感染症に関連している。感染症に関連する免疫原性ポリペプチドの

一例は、ヒト型結核菌抗原Mtb8.4(Colerら、J. Immunol.、161:(5):2356-64(1998))又はMtb39(Mtb39Aとしても公知; Dillonら、Infect. Immun.、67(6):2941-50(1999))のような、ヒト型結核菌由来の抗原である。

【0058】

免疫原性ポリペプチドは既知のものでも未知のものでもよい。未知の免疫原性ポリペプチドは、癌又は前癌状態の被験者又は感染症の被験者の組織からのhsp110又はgrp170の精製に付随して得ることができ、別の態様において、免疫原性ポリペプチドは既知の抗原を含む。

【0059】

免疫原性ポリペプチドは一般に、Paulの「基礎免疫学(Fundamental Immunology)」、第4版、663-665(Lippincott-Raven Publishers社、1999)及びそこに引用された参考文献に要約されているような、周知の技術を用いて同定され得る。このような技術は、抗原特異性抗体、抗血清及び／又はT細胞株又はクローンと反応する能力についてのポリペプチドのスクリーニングを含む。本明細書に使用されるように、抗血清及び抗体は、これらが特異的に抗原に結合する場合は、抗原特異性である(すなわち、これらはELISA又は他のイムノアッセイ法においてタンパク質と反応し、かつ無関係のタンパク質とは検出できるように反応しない)。このような抗血清及び抗体は、周知の技術を用いて調製することができる。免疫原性ポリペプチドは、このような抗血清及び／又はT細胞と、完全長ポリペプチドの反応性よりも実質的に低くはないようなレベルで反応する(例えば、ELISA及び／又はT細胞反応性アッセイ法において)ような天然のタンパク質の一部であることができる。このような免疫原性部分は、このようなアッセイ法内で、完全長ポリペプチドの反応性と同様の又はより大きいレベルで反応することができる。このようなスクリーニングは、Harlow及びLaneの「抗体：実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory社、1988に記載されているもののような当業者に周知の方法を用いて、一般に行うことができる。例えば、ポリペプチドは、固相支持体上に固定され、かつ患者の血清と接触され、血清中の抗体を固定されたポリペプチドに結合させる。その後未結合の血清は取除かれ、かつ結合された抗体は、例えば¹²⁵I-標識したプロテインAを用い

て検出される。

[0 0 6 0]

本発明のストレスタンパク質複合体は、様々な方法を通じて得ることができる。ある例において、組換えhsp110又はgrp170は、細胞物質(例えば溶解液)と混合され、ストレスポリペプチドが細胞物質内の1種以上の免疫原性ポリペプチドと結合される。このような結合は、この混合物の加熱のような、ストレス条件により増強又は変更することができる。別の例において、標的細胞は、以後の精製のために標識(例えばHISタグ)されているhsp110又はgrp170でトランスフエクションされる。この例は、免疫原性物質の存在下で組換えストレスポリペプチドを作出する方法を提供する。更に別の例においては、熱又は他のストレス条件を用いて、ストレスポリペプチドの精製前に、標的細胞内にhsp110又はgrp170を誘導する。このストレス処理は、インサイチュー、インビトロ又は細胞培養で行うことができる。

[0 0 6 1]

一部の態様において、本発明は、ストレスポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを含む、増強された免疫原性を有するストレスタンパク質複合体を提供し、ここで複合体は加熱されている。このような加熱は、特にストレスポリペプチドが熱誘導性ストレスタンパク質を含む場合、ストレスタンパク質複合体のワクチンとしての効力を増大することができる。熱誘導性ストレスタンパク質の例は、hsp70及びhsp110を含むが、これらに限定されるものではない。ある態様において、加熱は、ストレスタンパク質複合体を含む組織を少なくともおおよそ38℃の温度に曝し、かつこの温度を、例えば一度に1℃毎、望ましい加熱レベルが得られるまで、徐々に上げていくことを含む。好ましくは、組織の温度は、おおよそ39.5±0.5℃となる。加熱時には、組織は、インビボ、インビトロであるか、又は宿主環境内に位置することができる。

[0 0 6 2]

本発明のストレスタンパク質複合体は、天然のストレスタンパク質の変種を含むことができる。本明細書で使用するポリペプチド「変種」は、そのポリペプチドの免疫原性は実質的に低下されないように、1個以上の置換、欠失、付加及

び／又は挿入において天然のストレスタンパク質と異なるポリペプチドである。別の表現をすると、抗原-特異性抗血清と反応する変種の能力は、天然のタンパク質に対して増強されるか又は変化しないか、もしくは天然のタンパク質に対して50%未満、好ましくは20%未満に減少され得る。このような変種は、一般に前述のポリペプチド配列のひとつの修飾、及び本明細書に記されたような抗原-特異性抗体又は抗血清による修飾されたポリペプチドの反応性の評価により同定され得る。好ましい変種は、1個以上の部分、例えばN末端リダー配列もしくは膜貫通ドメインなどが除去されているようなものを含む。別の好ましい変種は、小さい部分（例えば、1～30個のアミノ酸、好ましくは5～15個のアミノ酸）が成熟タンパク質のN末端及び／又はC末端から除去されているような変種を含む。

【 0 0 6 3 】

ポリペプチド変種は、同定されたポリペプチドに対して好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約90%及び最も好ましくは少なくとも約95%の同一性（前述のように決定された）を示す。

【 0 0 6 4 】

好ましくは、変種は、保存的置換を含む。「保存的置換」とは、アミノ酸が、同様の特性を有する別のアミノ酸と置換されるようなものであり、ペプチド化学分野の業者は、実質的に変更されることのないポリペプチドの二次構造及び疎水親水の特徴を予想すると思われる。アミノ酸置換は一般に、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性及び／又は両親媒性の特徴のような類似性を基に行うことができる。例えば、負帯電したアミノ酸は、アスパラギン酸及びグルタミン酸を含み；正帯電したアミノ酸は、リシン及びアルギニンを含み；及び、同様の親水度を有する非帯電の極性ヘッド基(polar head)を伴うアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン及びバリンであり；グリシン及びアラニン；アスパラギン及びグルタミン；並びに、セリン、トレオニン、フェニルアラニン及びチロシンがある。保存的変化を示し得る他のアミノ酸の群は、以下を含む：(1)ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr；(2)cys, ser, tyr, thr；(3)val, ile, leu, met, ala, phe；(4)lys, arg, his；及び、(5)phe, tyr, trp, his。変種は更に、又は代わりに、非保存的変化を含むこともできる。好ましい態様において、変種

ポリペプチドは、5個以下のアミノ酸の置換、欠失又は付加により、天然の配列とは異なる。変種は更に(又は代わりに)、例えばポリペプチドの免疫原性、二次構造及び疎水親水性に対し最小の影響を及ぼすような欠失又は付加により修飾することができる。

【 0 0 6 5 】

ポリペプチドは、翻訳時又は翻訳後にタンパク質の導入を指示するようなシグナル(又はリーダー)配列をタンパク質のN末端に含むことができる。ポリペプチドは更に、ポリペプチドの合成、精製又は同定を容易にするため、もしくはポリペプチドの固相支持体への結合を増強するために、リンカー又は他の配列に複合すること(例えば、poly-FEs)もできる。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域に複合することができる。

【 0 0 6 6 】

ポリペプチドは、下記実施例1に記された精製技術を含む、様々な周知の技術のいずれかを用いて調製することができる。ある態様において、ストレスポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドは、この精製技術の結果として腫瘍細胞又は病原体に感染された細胞から同時精製される。一部の態様において、腫瘍細胞又は感染細胞は、免疫原性ポリペプチドのストレスポリペプチドへの結合を増強するために、精製前に、ストレス処理される。例えば、この細胞は、数時間低レベルでの加熱(39.5~40℃)又は約1~約2時間の高レベルでの加熱(およそ43℃)により、インピトロにおいてストレス処理することができる。加えて、これらの細胞は、無酸素及び/又は虚血性又はタンパク毒素条件に曝露することにより、インピトロにおいてストレス処理することができる。被験者から摘出された腫瘍は、細胞断されかつ精製前にインピトロにおいて加熱される。

【 0 0 6 7 】

一部の態様において、ポリペプチドは、組成物が投与される予定の同一被験者から精製される。これらの態様において、腫瘍又は感染細胞の数を増加することが望ましい。このような細胞のスケールアップは、インピトロ又はインピボにおいて、例えばSCIDマウスシステムを用いて行うことができる。SCIDマウス宿主に与えるヒト被験者腫瘍の増大によるように、細胞が非ヒト細胞の存在下でスケ-

ルアップされる場合、腫瘍を浸潤しているであらうあらゆる非ヒト(例えばマウス)細胞からヒト細胞を精製するよう注意しなければならない。ポリペプチドが精製されたのと同じ被験者に組成物が投与されるようなこれらの態様において、hap110及びgrp170の両方の精製に加え、制限された量の出発材料の効力を最適化するための追加のポリペプチドのストレス処理が望ましい。

【 0 0 6 8 】

前述のようにDNA配列によりコードされた組換えポリペプチドは、当業者に公知の様々な発現ベクターのいずれかを用いDNA配列から容易に調製することができ。発現は、組換えペプチドをコードしているDNA分子を含む発現ベクターで形質転換又はトランスフェクションされたいずれか適当な宿主細胞において実現することができる。適当な宿主細胞は、原核生物、酵母及び高等真核生物の細胞を含む。好ましくは、使用される宿主細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、酵母、昆虫細胞又は哺乳類細胞株、例えばCOS又はCHOである。組換えタンパク質又はポリペプチドを培養培地に分泌する適当な宿主/ベクターシステムから得た上清は、最初に市販のフィルターを用いて濃縮することができる。濃縮後、濃縮物を、アフィニティーマトリックス又はイオン交換樹脂のような適当な精製マトリックスに適用することができる。最後に、1回以上の逆相HPLC工程を用い、組換えポリペプチドを更に精製することができる。

【 0 0 6 9 】

約100個未満のアミノ酸、及び一般には約50個未満のアミノ酸を有する一部分又は他の変種は、当業者に周知の技術を用いる合成手段により作出することもできる。例えば、このようなポリペプチドは、アミノ酸が成長しつつあるアミノ酸鎖に順次追加される、Merrifield固相合成法のような、市販の固相技術のいずれかを用いて合成することができる。Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2146(1963)を参照のこと。ポリペプチドの自動合成装置は、Perkin Elmer/Applied BioSystems Division社(フォスターシティ, CA)などの供給業者から市販されており、かつ製造業者の指示に従い操作することができる。

【 0 0 7 0 】

ポリペプチドは、Perkin Elmer/Applied BioSystems Division社の430Aペプチ

ド合成装置において、HPTU(0-ベンゾトリアゾールN,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸)活性化によるFMOC化学を用い合成することができる。Gly-Cys-Gly配列は、固定された表面に結合するか、もしくはペプチドを標識する複合の方法を提供するために、ペプチドのアミノ末端に結合することができる。ペプチドの固相支持体からの切断は、下記の切断混合物；トリフルオロ酢酸：エタンジチオール：チオアニソール：水：フェノール(40：1：2：2：3)を用いて行うことができる。切断の2時間後、ペプチドは、冷メチル-*t*-ブチル-エーテル中で沈殿することができる。その後このペプチドペレットは、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含有する水中に溶解され、かつC18逆相HPLCによる精製前に凍結乾燥される。水を溶媒とするアセトニトリル(0.1%TFA含有)の0%~60%勾配を用いて、ペプチドを溶離することができる。純粋な画分の凍結乾燥後、このペプチドを、電子スプレー(electrospray)又は他の種類の質量分析法及びアミノ酸解析により、ペプチドの特徴を決定することができる。

【 0 0 7 1 】

融合タンパク質

一部の態様において、ポリペプチドは、本明細書に記されたような複数のポリペプチドを含む、又は本明細書に記されたような少なくとも1種のポリペプチド及び無関係の配列を含む融合タンパク質である。一部の態様において、この融合タンパク質は、hsp110及び／又はgrp170のストレスポリペプチド及び免疫原性ポリペプチドを含む。免疫原性ポリペプチドは、腫瘍タンパク質又は感染症に関連するタンパク質の全て又は一部を含むことができる。

【 0 0 7 2 】

追加の融合パートナーを付加することができる。融合パートナーは、例えば、Tヘルパーエpiteープ、好ましくはヒトにより認識されるTヘルパーエpiteープの供給を補助することにより、免疫原性融合パートナーとして利用することができる。別の例の融合パートナーは、天然の組換えタンパク質よりもより高い収量でタンパク質の発現を補助する、発現エンハンサーとして利用することができる。ある好ましい融合パートナーは、免疫原性及び発現増強性の両方の融合パートナーである。別の融合パートナーは、タンパク質の溶解度を増大するか、又はタン

バク質が望ましい細胞内コンパートメントに標的化されることを可能にするように選択することができる。更に別の融合パートナーは、タンパク質の精製を促進するような、アフイニティータグを含む。

【 0 0 7 3 】

融合タンパク質は概して、化学共役を含む標準方法を用いて調製することができる。好ましくは、融合タンパク質は、発現システムにおいて、組換えタンパク質として発現され、非融合タンパク質に対して上昇したレベルの産生を可能にする。簡単に述べると、ポリペプチド成分をコードしているDNA配列は、個別に集成され、かつ適当な発現ベクターに連結される。あるポリペプチド成分をコードしているDNA配列の3'末端は、ペプチドリニカーを伴う又は伴わずに、第2のポリペプチド成分をコードしているDNA配列の5'末端に連結され、その結果これらの配列のリーディングフレームは相内(in phase)にある。これは、両方の成分ポリペプチドの生体活性を維持している単独の融合タンパク質への翻訳を可能にする。

【 0 0 7 4 】

ペプチドリニカー配列は、第一及び第2のポリペプチド成分を、各ポリペプチドの二次構造及び三次構造へのフォールディングを確実にするのに十分な距離で隔てるために使用することができる。このようなペプチドリニカー配列は、当技術分野において周知の標準方法を用いて、融合タンパク質に組込まれる。適当なペプチドリニカー配列は、下記の要因を基に選択することができる：(1)柔軟な拡大された立体構造を成すそれらの能力；(2)第一及び第2のポリペプチド上で機能性エピトープと相互作用することができる二次構造を成すそれらの能力のなさ；並びに、(3)ポリペプチド機能性エピトープと反応し得るような疎水性又は帯電した残基の欠如。好ましいペプチドリニカー配列は、Gly、Asn及びSer残基を含む。他のほば中性のアミノ酸、例えばThr及びAlaなども、リンカー配列において使用することができる。リンカーとして有用に利用されるアミノ酸配列は、Murphyら、Gene、40:39-46(1985)；Murphyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83:8258-8262(1986)；米国特許第4,935,233号及び米国特許第4,751,180号に開示されている。このリンカー配列は一般に、長さが1〜約50個のアミノ酸により形成

されている。第一及び第2のポリペプチドが、機能ドメインを分離しかつ立体配置的干渉を防ぐために使用される非必須のN末端アミノ酸領域を有する場合は、リンカー配列を必要としない。

【 0 0 7 5 】

連結されたDNA配列は、適当な転写又は翻訳の調節エレメントに機能的に連結されている。DNAの発現に寄与する調節エレメントは、第1のポリペプチドをコードしているDNA配列の5'側に位置する。同様に、翻訳の終結に必要な終結コドン及び転写終結シグナルは、第2のポリペプチドをコードしているDNA配列の3'側に存在する。

【 0 0 7 6 】

本発明のポリペプチドを無関係の免疫原性タンパク質と共に含むような融合タンパク質も提供される。好ましくはこの免疫原性タンパク質は、記憶応答を誘起することが可能である。このようなタンパク質の例は、破傷風、結核及び肝炎タンパク質を含む(例えば、Stouteら、New Engl. J. Med., 336:86-91(1997))を参照のこと)。

【 0 0 7 7 】

好ましい態様において、免疫原性融合パートナーは、グラム陰性菌Haemophilus influenza Bの表面タンパク質であるプロテインDに由来する(国際公開公報第91/18926号)。好ましいプロテインD誘導体は、ほぼ1/3のタンパク質(例えば、最初のN末端側の100~110個のアミノ酸)を含み、かつプロテインD誘導体は、脂質化(lipidate)される。ある好ましい態様において、リポタンパク質D融合パートナーの最初の109個の残基はN末端に含まれ、追加の外来性T-細胞エпитオープを伴うポリペプチドを提供し、かつ、大腸菌における発現レベルを増大する(従って、発現エンハンサーとして機能する)。リピド尾は、抗原の抗原提示細胞への最適な提示を確実にする。他の融合パートナーは、インフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質であるNS I(ヘマグルチニン)を含む。典型的には、N末端側の81個のアミノ酸が使用されるが、T-ヘルパーエピトープを含む異なる断片を使用することができる。

【 0 0 7 8 】

別の態様において、免疫学的融合パートナーは、LYTAとして公知のタンパク質、又はその一部である(好ましくはC末端部分)。LYTAは、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に由来し、これはアミダーゼLYTAとして公知のN-アセチル-L-アラニンアミダーゼを合成する(LyIA遺伝子によりコードされる; Gene, 43:265-292(1986))。LYTAは、ペプチドグリカン主鎖中のある結合を特異的に分解する自己溶菌酵素である。LYTAタンパク質のC末端ドメインは、コリン又はDEARのような一部のコリン類似体への親和性に寄与している。この特性は、融合タンパク質の発現に有用な大腸菌CLYTA発現プラスミドの開発に活用されている。アミノ末端にC-LYTA断片を含むハイレトリッドタンパク質の精製が説明されている(Biotechnology, 10:795-798(1992)参照)。好ましい態様において、LYTAの反復部分を、融合タンパク質に組み込むことができる。反復部分は、残基178で始まるC末端領域に認められる。特に好ましい反復部分は、残基188~305に組込まれる。

【 0 0 7 9 】

概して、本明細書に記されたポリペプチド(融合タンパク質を含む)及びポリヌクレオチドは単離される。「単離された」ポリペプチド又はポリヌクレオチドとは、その当初の環境から取除かれたものである。例えば、天然のタンパク質が、天然のシステムにおいて同時に存在する物質の一部又は全てから分離されている場合は、単離されている。

【 0 0 8 0 】

好ましくは、このようなポリペプチドは、少なくとも純度約90%であり、より好ましくは少なくとも純度約95%であり、及び最も好ましくは少なくとも純度約99%である。ポリヌクレオチドは、例えば天然の環境の一部ではないベクターにクローニングされる場合に、単離されていると見なされる。

【 0 0 8 1 】

T細胞

免疫療法用組成物は、更に、又は代わりに、免疫原性ポリペプチドに複合されたストレスタンパク質(「ストレスタンパク質複合体」)に特異的なT細胞を含むことができる。このような細胞は一般に、常法を用い、インビトロ又はエキスポにおいて調製される。例えば、T細胞は、Nexell Therapeutics社(アービン、

CA)から入手できるISOLEX(登録商標)磁気細胞選択システム(同じく米国特許第5,536,475号参照);又は、Pan T Cell Isolation Kit、CD4+ T Cell Isolation Kit、及びCD8+ T Cell Isolation Kitを含む、Miltenyi Biotec社のMACS細胞分離技術(同じく米国特許第5,240,856号;米国特許第5,215,926号;国際公開公報第89/06280号;国際公開公報第91/16116号及び国際公開公報第92/07243号も参照)のような、市販の細胞分離システムを用い、患者の骨髓、末梢血、又は骨髓もしくは末梢血の画分から単離することができる。あるいは、T細胞は、関連する又は無関係のヒト、非ヒト哺乳類、細胞株又は培養物に由来することができる。

【 0 0 8 2 】

T細胞は、ストレスタンパク質複合体、ストレスタンパク質複合体をコードしているポリヌクレオチド及び/又はストレスタンパク質複合体を発現している抗原提示細胞(APC)で刺激することができる。この刺激は、ポリペプチドに特異的なT細胞の生成を可能にするような条件下及び十分な時間で行われる。ストレスポリペプチド又はポリヌクレオチドは、特異的T細胞の生成を促進するために、ミクロソームのような、送達ビヒクル内に存在することが好ましい。

【 0 0 8 3 】

T細胞がポリペプチドで被覆された又はポリペプチドをコードしている遺伝子を発現している標的細胞を殺傷するならば、このT細胞は、ストレスポリペプチドに特異的であると考えられる。T細胞特異性は、様々な標準技術のいずれかをを用いて評価することができる。例えば、クロム放出アッセイ法又は増殖アッセイ法において、溶解及び/又は増殖において、陰性対照と比較して2倍以上大きい刺激指数は、T細胞特異性を示している。このようなアッセイ法は、例えばChenら、Cancer Res., 54:1065-1070(1994)に記されている。

【 0 0 8 4 】

T細胞増殖の検出は、様々な公知の技術により達成することができる。例えばT細胞増殖は、DNA合成の増加率を測定することにより検出することができる(例えば、トリチウム化されたチミジンによるT細胞培養物のパルス-標識により、及びDNAに組込まれたトリチウム化されたチミジンの量の測定により)。ストレスタンパク質複合体(100ng/ml~100μg/ml、好ましくは200ng/ml~25μg/ml)との3

～7日間の接触は、T細胞増殖の少なくとも2倍の増加を生じるはずである。前述の2～3時間の接触は、標準のサイトカインアッセイ法を用いて測定されるような、T細胞の活性化を生じ、ここではサイトカイン(例えばTNF又はIFN- γ)放出レベルの2倍の増加がT細胞活性化を示している(Coliganら「免疫学最新プロトコール(Current Protocols in Immunology)」、第1巻、Wiley Interscience社、(Greene, 1998))。ストレスポリペプチド、ポリヌクレオチド又はポリペプチド発現APCへの反応により活性化されているT細胞は、CD4+及び/又はCD8+であることができる。T細胞は、標準技術を用いて増殖することができる。

【0085】

好ましい態様において、T細胞は、患者又は関連するもしくは無関係のドナーのいずれかに由来し、かつ刺激及び増殖後に、その患者に投与することができる。治療目的で、ストレスポリペプチド、ポリヌクレオチド又はAPCへの反応により増殖されるCD4+又はCD8+ T細胞は、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて数の上で増大することができる。インビトロにおけるこのようなT細胞の増殖は、様々な方法で達成することができる。例えば、T細胞は、インターロイキン-2のようなT細胞増殖因子、及び/又はストレストランスタンパク質複合体を合成する刺激細胞(stimulator cell)の添加のあり又はなしで、免疫原性ポリペプチドと複合されたストレスポリペプチドに再曝露することができる。あるいは、ストレストランスタンパク質複合体の存在下で増殖する1種以上のT細胞は、クローニングにより数の上で増殖することができる。細胞のクローニング法は当技術分野において周知であり、かつ限定希釈法を含む。

【0086】

薬学的組成物及びワクチン

本発明は、免疫原性組成物(すなわち、ワクチン)を含む薬学的組成物に混入されている、ストレストランスタンパク質複合体ポリペプチド、ポリヌクレオチド、T細胞及び/又は抗原提示細胞を提供する。薬学的組成物は、1種以上のこのような化合物、及び任意に生理的に許容される担体を含むしている。ワクチンは、1種以上のこのような化合物、及び非特異的免疫応答能賦活剤として利用するアジュバントを含むことができる。アジュバントは、外来性抗原に対する免疫応答を賦活

するいずれかの物質であることができる。アジュバントの例は、通常のアジュバント、生分解性ミクロスフェア(例えば、ポリ乳酸ガラクトド(poly-lactic galactide))、免疫刺激性オリゴヌクレオチド及びポリボソーム(その中に化合物が混入されている; 例えばFellertonの米国特許第4,235,877号参照のこと)を含む。ワクチン調製は一般に、例えばM.F. Powell及びM.J. Newman. 編集「ワクチンデザイン(サブユニット及びアジュバント法)」, Plenum Press社(NY, 1995)に記されている。本発明の範囲内の薬学的組成物及びワクチンは更に、生物学的に活性又は不活性であることができるような他の化合物を含有することができる。例えば、他の腫瘍抗原の1種以上の免疫原性部分が、組成物又はワクチン内に、融合ポリペプチドに混入されるか又は個別の化合物としてのいずれかで、存在することができ。

【 0 0 8 7 】

薬学的組成物又はワクチンは、前述の1種以上のポリペプチドをコードしているDNAを含むことができ、その結果ポリペプチドがインサイチューにおいて生成される。前述のように、DNAは、核酸発現システム、細菌及びウイルスの発現システムを含む、当業者に公知の様々な送達システムのいずれかの中に存在することとができる。多くの遺伝子送達技術が、当技術分野において周知であり、例としてRolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 15:143-198(1998)、及びそこに引用された文献に記載されている。適当な核酸発現システムは、患者における発現に必要なDNAシステムを含む(適当なプロモーター及び終結シグナルなど)。細菌送達システムは、その細胞表面にポリペプチドの免疫原性部分を発現しかつそのようなエピトープを分泌する細菌(Bacillus-Calmette-Guerrinなど)の投与に関連している。

【 0 0 8 8 】

好ましい態様において、DNAは、ウイルス発現システム(例えば、ワクシニア又は他のポックスウイルス、レトロウイルス、もしくはアデノウイルス)を用いて導入することができる、これらは非病原性(防御性)、複製コンピテントウイルスの使用に関連している。適当なシステムは、例えばFisher-Hochら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:317-321(1989); Flexnerら、Ann. N. Y. Acad. Sci., 569:8

6-101(1989); Flexnerら、Vaccine、8:17-21(1990); 米国特許第4,603,112号、同第4,769,330号、及び同第5,017,487号; 国際公開公報第89/01973号; 米国特許第4,777,127号; 英国特許第2,200,651号; 欧州特許第0,345,242号; 国際公開公報第91/02805号; Berkner、Biotechniques、6:616-627(1988); Rosenfeldら、Science、252:431-434(1991); Kollisら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:215-219(1994); Kass-Eislerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:11498-11502(1993); Guzmanら、Circulation、88:2838-2848(1993); 及び、Guzmanら、Cir. Res.、73:1202-1207(1993)に開示されている。このような発現システムへのDNAの混入技術は、当業者には周知である。これらのDNAは更に、例えばUlmerら、Science、259:1745-1749(1993)に説明され、かつCohen、Science、259:1691-1692(1993)において検証されたように、「裸」であることができる。裸のDNAの取り込みは、細胞に効率的に輸送される、生分解性ビーズ上をDNA被覆することにより増加することができる。

【 0 0 8 9 】

当業者に公知のいずれか適当な担体を本発明の薬学的組成物において利用することができるが、担体の種類は投与様式に応じて変動すると思われる。本発明の組成物は、例えば、担体の局所、経口、点鼻、静脈内、腹腔内、皮下又は筋肉内投与を含む、投与のいずれか適当な方法のために製剤することができる。皮下注射のような非経口投与について、担体は、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックス又は緩衝液を含むことが好ましい。経口投与について、マンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、及び炭酸マグネシウムのような、前述の担体又は固形担体のいずれかを使用することができる。生分解性ミクロスフェア(例えばポリラクテートポリグリコレート)も、本発明の薬学的組成物のための担体として使用することができる。適当な生分解性ミクロスフェアは、例えば米国特許第4,897,268号及び第5,075,109号に開示されている。

【 0 0 9 0 】

このような組成物は更に、緩衝液(例えば、中性に緩衝した生理食塩水又はリン酸緩衝生理食塩水)、炭水化物(例えば、グルコース、マンノース、スクロース

、又はデキストラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、又はグリシンのようなアミノ酸、酸化防止剤、キレート剤、例えばEDTA又はグルタチオン、アジュバント(例えば水酸化アルミニウム)及び/又は保存剤も含むことができる。あるいは、本発明の組成物は凍結乾燥剤として製剤することもできる。化合物は、周知の技術を用いてリポソーム内に封入することもできる。

【 0 0 9 1 】

様々なアジュバントのいずれかを、本発明のワクチンにおいて使用することができる。ほとんどのアジュバントは、急激な代謝から抗原を保護するようにデザインされた基質、例えば水酸化アルミニウム又は鉱油、及び免疫応答賦活剤、例えばリピドA、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)又はヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)由来のタンパク質などを含む。適当なアジュバントは市販されており、例としてフロイントの不完全アジュバント及び完全アジュバント(Difco Laboratories社、デトロイト、MI)；メルクアジュバント65(Merck社、ロウエイ、NJ)；水酸化アルミニウムゲル(アルム)又はリン酸アルミニウムのようなアルミニウム塩；カルシウム、鉄又は亜鉛の塩；アシル化されたチロシン、アシル化された糖の不溶性懸濁液；カチオン性又はアニオン性の多糖誘導体；ポリホスファゼン生分解性ミクロスフェア；モノホスホリリピドA及びクイルAがある。GM-CSF又はインターロイキン2、-7又は-12のようなサイトカイン類も、アジュバントとして使用することができる。

【 0 0 9 2 】

本明細書において提供されたワクチンにおいて、アジュバント組成物は、主にTh1型免疫応答を誘導するようにデザインされることが好ましい。高レベルのTh1型サイトカイン類(例えば、IFN- α 、IL-2及びIL-12)は、投与された抗原に対する細胞媒介型免疫応答を誘起するのに好ましい傾向がある。対照的に、高レベルのTh2型サイトカイン類(例えば、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10及びTNF- β)は、体液性免疫応答を誘起するのに好ましい傾向がある。本明細書において提供されるようなワクチンの適応後、患者は、Th1-及びTh2-型応答を含む免疫応答を支持すると思われる。主に応答がTh1-型であるような好ましい態様において、Th1-型サイトカインのレベルは、Th2-型サイトカインのレベルよりもはるかに大きく増大す

ると思われる。これらのサイトカインのレベルは、標準アッセイ法を用い、容易に評価することができる。サイトカインファミリーの検証については、Mosmann 及びCoffman、Ann. Rev. Immunol.、7:145-173(1989)を参照のこと。

【 0 0 9 3 】

主にTh1-型応答の誘起に使用するのに好ましいアジュバントは、例えばモノホスホリルリピドA、好ましくは3-デオ-0-アシル化されたモノホスホリルリピドA(3D-MPL)のアルミニウム塩との組合せを含む。MPLアジュバントは、Corixa社(ハミルトン、MT)から入手することができる(米国特許第4,436,727号；同第4,877,611号；同第4,866,034号、及び同第4,912,094号を参照のこと)。CpG-含有オリゴヌクレオチド(CpGジヌクレオチドはメチル化されていない)も、主にTh1-応答を誘導する。このようなオリゴヌクレオチドは周知であり、かつ国際公開公報第96/02555号に開示されている。別の好ましいアジュバントは、サポニン、好ましくはQS21であり、これは単独で又は他のアジュバントと併用することができる。例えば、増強されたシステムは、モノホスホリルリピドA及びのようなサポニン誘導体の組合せ、例えば国際公開公報第94/00153号に開示されているようなQS21及び313MPLの組合せ、もしくは国際公開公報第96/33739号に開示されたQS21がコレステロールにより消滅されるような、余り反応によって生成されない(reactogenic)組成物に関連する。他の好ましい製剤は、水中油型乳剤及びトコフェノールを含むしている。水中油型乳剤中のQS21、3D-MPL及びトコフェノールに関連する特効力のあるアジュバント製剤は、国際公開公報第95/17210号に開示されている。使用することができる別のアジュバントは、AS-2である(Smith-Kline Beecham 社)。本明細書において提供されたあらゆるワクチンは、抗原、免疫応答賦活剤及び適当な担体又は賦形剤の組合せを生じるような周知の方法を用いて調製することができる。

【 0 0 9 4 】

本発明のストレスポリペプチドは、更にTh1-型応答を主に誘起するアジュバントとしても使用することができる。ストレスポリペプチドは、免疫原性ポリペプチド及び任意に追加のアジュバントを含む他のワクチン成分と組合せて使用することができる。

【 0 0 9 5 】

本明細書に記した組成物は、徐放性製剤(すなわち、投与後の化合物の緩徐な放出を実現するカプセル又はスポンジ型の製剤)の一部として投与することができ、このような製剤は概して、周知の技術を用いて調製することができ、かつ例えば経口的、経直腸的又は皮下埋植により、もしくは所望の標的部位への移植により投与することができる。徐放性製剤は、担体マトリックス中に分散された及び／又は速度制御御膜で周囲を取り囲まれた貯蔵器に含まれたポリペプチド、ポリヌクレオチド又は抗体を含有することができる。このような製剤に使用するための担体は、生体適合性であり、かつ更に生分解性であり；好ましくはこの製剤は、比較的一定レベルの有効成分の放出をもたらず。徐放性製剤内に含まれた有効化合物の量は、移植部位、放出の速度及び期待される期間、並びに治療又は予防される病態の性質により左右される。

【 0 0 9 6 】

抗原提示細胞

様々な送達ビヒクルのいずれかを、薬学的組成物及びワクチンにおいて、腫瘍細胞又は感染細胞を標的化する抗原-特異性免疫応答の成立を促進するために使用することができる。送達ビヒクルは、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球及び効果的APCであるように操作され得る他の細胞のような、抗原提示細胞(APC)を含む。このような細胞は、抗原を提示する能力を増大し、T細胞応答の活性化及び／又は維持を改善し、それ自身抗腫瘍又は抗感染作用を有し、及び／又は受容者に免疫学的に適合できる(すなわちBLAハロタイプの合致)ように遺伝子修飾されるが、必ずしもではない。APCは一般に、様々な生物学的液体並びに腫瘍及び前癌組織を含む器官のいずれかから単離され、かつ自家細胞、異系細胞、同系細胞又は異種細胞であることができる。

【 0 0 9 7 】

ある好ましい本発明の態様は、抗原提示細胞として、樹状細胞又はそれらの前駆体を使用する。樹状細胞は、高度に効力のあるAPCであり(Banchereau及びSteinman, Nature, 392:245-251(1998))、かつ予防的又は治療的抗腫瘍免疫を誘起するのに生理的アジュバントとして有効であることが示されている(Timmerman及び

Levy, Ann. Rev. Med., 50:507-529(1999)を参照)。一般に樹状細胞は、それらの典型的形状を基に(インサイチュ一星状、インビトロにおいて認められる細胞質プロセシング(樹状突起))、並びに標準アッセイ法により決定されるB細胞(CD19及びCD20)、T細胞(CD3)、単球(CD14)及びナチュラルキラー細胞(CD56)の識別マーカーの欠損を基に同定することができる。樹状細胞は、当然、インビボ又はエクスピボにおいて樹状細胞上に通常は認められないような特異的細胞表面受容体又はリガンドを発現するように操作することができ、かつこのような修飾された樹状細胞は、本発明により考察されている。樹状細胞の代わりに、分泌型小胞抗原-負荷した樹状細胞(いわゆるエキソソーム)は、ワクチンにおいて使用される(Zitvogelら、Nature Med., 4:594-600(1998))。

【 0 0 9 8 】

樹状細胞及び前駆細胞は、末梢血、骨髓、腫瘍-浸潤細胞、腫瘍周辺組織-浸潤細胞、リンパ節、脾、皮膚、臍帯血又はいずれか適当な組織又は液体から得ることができる。例えば、樹状細胞は、末梢血から収集された単球培養物へ、GM-CSF、IL-4、IL-13及び/又はTNF α のようなサイトカインの組合せの添加により、エクスピボにおいて分化することができる。あるいは、末梢血、臍帯血又は骨髓から収集されたCD34陽性細胞は、GM-CSF、IL-3、TNF α 、CD40リガンド、LPS、flit3リガンド及び/又は樹状細胞の成熟及び増殖を誘導する他の成分の組合せの培養培地への添加により、樹状細胞に分化することができる。

【 0 0 9 9 】

樹状細胞は、都合良く「未成熟」及び「成熟」細胞として分類され、これら2種の良く特徴付けられた表現型の間の識別する簡単な方法がある。しかし、この命名法は、全ての可能性のある分化の中間段階を排除するようには構築されない。未成熟な樹状細胞は、抗原取り込み及びプロセシングの高い能力を伴うAPCとして特徴付けられ、これはFc γ 受容体、マンノース受容体及びDEC-205マーカーの高い発現に相関している。成熟表現型は典型的には、これらのマーカーの比較的低い発現、しかしクラスI及びクラスII NMC、接着分子(例えばCD54及びCD11)、並びに補助的刺激分子(例えばCD40、CD80及びCD86)のような、T細胞活性化に寄与する細胞表面分子の高い発現により特徴付けられる。

【 0 1 0 0 】

APCは一般に、ストレストランバク質(又はその一部もしくは他の変種)をコードしているポリヌクレオチドによりトランススクリプションされ、その結果ストレスポリペプチド又はその免疫原性部分は細胞表面に発現される。このようなトランススクリプションは、エクスピボで生じ、かつ次にこのようなトランススクリプションされた細胞を含む組成物又はワクチンは、本明細書に記載されたように治療目的に使用することができる。あるいは、樹状細胞又は他の抗原提示細胞を標的化する遺伝子送達ビヒクルを、患者に投与することができ、その結果インピボでトランススクリプションを生じる。樹状細胞のインピボ及びエクスピボトランススクリプションは、例えば一般に国際公開公報第97/24447号に開示されているような当技術分野において公知の技術、又はMahviら、Immunology and Cell Biology、5:456-460(1997)に記載された遺伝子銃法を用いて実施される。樹状細胞の抗原負荷は、樹状細胞又は前駆細胞を、ストレスポリペプチド、DNA(裸の又はプラスミドベクター内)もしくはRNAと；又は抗原を発現している組換え細菌もしくはウイルス(例えば、ワクシニア、トリボックス、アデノウイルス又はレンチウイルスベクター)と、インキュベーションすることにより実現することができる。負荷の前に、このポリペプチドは、T細胞補助(例えば担体分子)を提供する免疫原性パートナーと共有結合的に複合することができる。あるいは、樹状細胞は、複合されていない免疫学的パートナーで、個別に又はポリペプチドの存在下でパルスすることができる。

【 0 1 0 1 】

治療的及び予防的方法

本発明のストレストランバク質複合体及び薬学的組成物は、被験者に投与することができ、これによりヒト型結核菌感染を阻害し、腫瘍増殖を阻害し、癌の発症を阻害し、及び癌又は感染症を治療又は予防する方法が提供される。

【 0 1 0 2 】

処置は、予防及び治療を含む。予防又は治療は、単独の時点又は複数の時点で、単独又は複数の部位への単独直接注射(single direct injection)により実施することができる。更に投与は、複数の部位にほぼ同時に行うことができる。

【 0 1 0 3 】

患者又は被験者は、哺乳類、例えばヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、及びヒツジ動物を含む。被験者はヒトが好ましく、かつ癌又は疾患に罹患していてもしていただくともよい。

【 0 1 0 4 】

一部の態様において、治療又は予防される病態は、癌又は前癌状態(例えば、過形成、形成異常、異形成)である。癌の例は、繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、脊索肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、偽性粘液腫、リンパ管内皮腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫、平滑筋腫、横紋筋腫、結腸癌、痔癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗管腺腫、脂腺腺腫、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛上皮癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮細胞癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、希突起膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、及びH鎖疾患を含むが、これらに限定されるものではない。

【 0 1 0 5 】

一部の態様において、治療又は予防されるべき病態は、感染症である。感染症の例は、病原体、ウイルス、細菌、真菌又は寄生体の感染症を含むが、これらに限定されるものではない。ウイルスの例は、B型又はC型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型又はII型単純ヘルペスウイルス、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルスI型又はII型を含むが、これらに限定されるものではない。細菌の例は、ヒト型結核菌、ミコバクテリウム、マイコプラズマ、ナイセリア及びレジオネラを含むが、これらに限定されるものではない。寄生体の例は、リケッチア及びクラミジアを含むが、これら

に限定されるものではない。

【 0 1 0 6 】

従って、前述の薬学的組成物及びワクチンは、癌又は感染症の発症の防止もしくは癌又は感染症に罹患した患者の治療に使用することができる。癌は、悪性腫瘍の存在を含む、当技術分野において一般に受け入れられている診断基準を用いて診断することができる。薬学的組成物及びワクチンを、手術による原発性腫瘍除去及び／又は放射線療法又は通常の化学療法薬の投与のような治療の、以前又は以後に投与することができる。

【 0 1 0 7 】

ある態様において、免疫療法は、能動免疫療法であってよく、この場合治療は、免疫応答修飾物質(本明細書に記されたポリペプチド及びポリヌクレオチドなど)の投与が腫瘍又は感染細胞に対し反応するように内因性宿主免疫系をインデュースすることによって行われている。

【 0 1 0 8 】

別の態様において、免疫療法は、受動免疫療法であってよく、この場合治療は、抗腫瘍作用を直接又は間接に媒介することができる完全な宿主免疫系には必ずしも左右されないような、確立された腫瘍免疫反応性を伴う物質(エフェクター細胞又は抗体など)の送達に関連している。エフェクター細胞の例は、前述のようなT細胞、Tリンパ球(CD8+細胞傷害性Tリンパ球及びCD4+ T-ヘルパー腫瘍-浸潤リンパ球)、キラー細胞(ナチュラルキラー細胞及びリンホカイン活性化キラー細胞)、B細胞及び本明細書で提供されたポリペプチドを発現している抗原提示細胞(樹状細胞及びマクロファージなど)を含む。好ましい態様において、樹状細胞は、インビトロにおいて、ポリペプチドを発現するように修飾され、かつこれらの修飾されたAPCが被験者に投与される。本明細書で言及されたポリペプチドに特異的なT細胞受容体及び抗体受容体は、養子免疫療法のためには、クロニングされ、発現され、かつ他のベクター又はエフェクター細胞に導入される。本明細書に提供されたポリペプチドは、受動免疫療法のために、抗体又は抗イデオタイプ抗体の作製に使用することができる(前記及び米国特許第4,918,164号に開示)。

【0109】

エフェクター細胞は、一般に本明細書に記されたようなインビトロにおいて増殖することにより養子免疫療法に十分な量得ることができる。単独の抗原特異性エフェクター細胞をインビボでの抗原認識を維持しつつ数の上で数十億個に増殖する培養条件は、当技術分野において周知である。このようなインビトロ培養条件は、典型的には、抗原による間欠刺激を使用し、サイトカイン(IL-2など)及び非分割フィーダー細胞の存在下であることが多い。前述のように、本明細書に記された免疫反応性ポリペプチドは、免疫療法に十分な数の細胞を作製するための、抗原特異性T細胞培養物の迅速な増殖に使用することができる。

【0110】

特に、樹状細胞、マクロファージ、単球、繊維芽細胞及び／又はB細胞のような抗原提示細胞は、当技術分野において周知の標準技術を用い免疫反応性ポリペプチドでパルスするか、もしくは1種以上のポリヌクレオチドによりトランスフェクションすることができる。例えば、抗原提示細胞を、組換えウイルス又は他の発現システムにおける発現の増大に適したプロモーターを有するポリヌクレオチドでトランスフェクションすることができる。治療に使用するために培養したエフェクター細胞は、増殖しかつ広範に分布し、かつインビボにおいて長期間生存することができる。培養したエフェクター細胞は、IL-2を補充した抗原による反復刺激により、インビボ増殖し、かつかなりの数が長期間生存するように誘導することができる(例えばCheeverら、Immunological Reviews、157:177(1997)参照)。

【0111】

あるいは、本明細書で言及したポリペプチドを発現しているベクターは、患者から採取された抗原提示細胞に導入され、かつ同じ患者への戻し移植のためにエクスビボにおいてコロニー増殖される。トランスフェクションされた細胞は、当技術分野において公知の手段を用い、好ましくは静脈内、腔内、腹腔内又は腫瘍内投与により無菌型で、患者に再導入することができる。

【0112】

投与及び用量

前記組成物は、多くは薬学的に許容される担体と共に、いずれか適当な方法で投与される。本発明の状況における被験者への適当な細胞投与方法を利用でき、かつ1種よりも多い経路を用いて特定の細胞組成物を投与することができるが、特定の経路が、他の経路よりもより迅速かつより効果的な反応を提供することが多い。

【 0 1 1 3 】

患者に投与される用量は、本発明の状況において、長期にわたり患者において有益な治療反応を實現するか、もしくはは感染又は感染に起因した疾患を阻害するのに十分なものでなければならぬ。従って、組成物は、被験者に、特異的抗原に対する効果的免疫応答を惹起するか、及び／又は、疾患又は感染症の症状及び／又は合併症を緩和、軽減、治癒又は少なくとも一部停止するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適した量は、「治療有効量」と定義される。

【 0 1 1 4 】

本明細書に開示された治療用組成物の投与経路及び頻度、更には用量は、個体毎に変動し、かつ標準技術を用いて容易に確立することができる。概して、薬学的組成物及びワクチンは、注射(例えば、皮内、腫瘍内、筋肉内、静脈内、又は皮下)、点鼻(例えば、吸引)又は経口により投与することができる。好ましくは、1～10回投与量を、52週間にわたって投与する。好ましくは、6回投与量を、1ヶ月間隔で投与し、かつその後定期的に追加免疫ワクチンが投与される。別のプロトコールが個々の患者に適していることがある。ある態様において、組成物の2回の皮内注射が10日間間をあけて投与される。

【 0 1 1 5 】

適当な投与量は、前述のように投与された場合に、抗腫瘍免疫応答を促進することが可能であり、かつこれは基準レベル(未治療)よりも少なくとも10～50%高いような化合物の量である。このような応答は、例えば、患者内の抗腫瘍抗体を測定するか又はインビボにおいて患者の腫瘍細胞を殺傷することが可能であるような細胞溶解性エフェクター細胞のワクチン-依存型生成によりモニタリングされる。このようなワクチンは、更に、ワクチン投与された患者において、ワクチン投与されない患者と比べて、改善された臨床の転帰(例えば、より頻繁な寛解

、完全又は部分的又は長期の疾患を伴わない生存)につながるような免疫応答を惹起することが可能である。概して1種以上のポリペプチドを含有する薬学的組成物及びワクチンについて、1回投与量中に存在する各ポリペプチドの量は、約100 μ g \sim 5mg/宿主体重kgである。適当な容量は、患者のサイズによって変動するが、典型的には約0.1mL \sim 約5mLである。

【 0 1 1 6 】

概して、適当な用量及び治療方式は、治療的及び/又は予防的利点を提供するのに十分な量の有効化合物を提供する。このような反応は、治療を受けた患者において、未治療の患者よりもより改善された臨床の転帰(例えば、より頻繁な寛解、完全又は部分的又は長期の疾患を伴わない生存)を確立することにより、モニタリングすることができ。腫瘍タンパク質に対する予め存在する免疫応答の増加は、一般に改善された臨床の転帰に相関している。このような免疫応答は、一般に標準の増殖アッセイ法、細胞毒性アッセイ法又はサイトカインアッセイ法を用いて評価され、これらは治療前及び後の患者から得た試料を用いて行うことができる。

【 0 1 1 7 】

実施例

以下の実施例は、本発明を例示するため、ならびに当業者が本発明を製造および使用するのを助けるために示される。実施例は、それ以外の点で本発明の範囲を制限することがどのようなにも意図されない。

【 0 1 1 8 】

実施例 1: hsp110、grp170、および grp78 の精製

本実施例は、hsp110およびgrp170の精製ならびにgrp78の精製の手順について述べる。この結果は、調製物の同一性および純度を裏付ける。

【 0 1 1 9 】

材料および方法

ダンス型ホモジナイザーを用いて、5倍体積の低張緩衝液(30mM重碳酸ナトリウム(pH7.2)、1mM PMSF)中で、細胞ペレットまたは組織をホモジナイズした。溶解産物を4500g、次いで100,000gで遠心分離して、破壊されなかった細胞、核、お

よび他の組織破片を除去した。上清を100,000gで2時間さらに遠心分離した。上清を、20mM Tris-HCl、50mM NaCl、1mM MgCl₂、1mM CaCl₂、1mM MnCl₂で予め平衡化されたコンカナバリンA-セファロースビーズ(最初の材料1ml当たりカラム体積1ml)にアブライした。結合タンパク質を、15% a-D-メチルマンノシド(a-D-MM)を含む結合緩衝液Aで溶出した。

【 0 1 2 0 】

Hsp110の精製のために、ConA-セファロースに結合しなかった材料を、20mM Tris-HCl (pH7.5)、200mM NaClで平衡化されたMono Q (Pharmacia) 10/10カラムにアブライした。結合タンパク質を、同じ緩衝液を用いて、500mM塩化ナトリウムまでの直線塩勾配(FR:3ml/分, 40% ~ 60% B/60分)により溶出した。画分を収集し、SDS-PAGEにより、次に、抗hsp110抗体を用いたイムノブロットイングにより分析した。hsp110を含むブールされた画分(270mM ~ 300mM)をセントリプラス(Centriplus) (Amicon, Beverly, MA)により濃縮し、スーパーロース(Superose) 12カラムにアブライした。タンパク質を、流速0.2ml/分で、40mM Tris HCl (pH8.0)、150mM NaClにより溶出した。画分をイムノブロットおよび銀染色により検査した。

【 0 1 2 1 】

Grp170の精製のために、10% α-メチルマンノシドにより溶出されたConA-セファロースに結合した材料を、最初に、20mM Tris HCl (pH7.5)、150mM NaClで平衡化されたMono Qカラムにアブライし、150 ~ 500mM NaCl勾配により溶出した。Grp170は300mM ~ 350mM NaClの間で溶出された。ブールされた画分を濃縮し、スーパーロース12カラムにアブライした。均一なgrp170を含む画分を収集し、SDS-PAGEにより、次に、抗grp170抗体を用いたイムノブロットイングにより分析した。

【 0 1 2 2 】

Grp78(Bip)の精製のために、ConA-セファロースに結合しなかったタンパク質を、結合緩衝液B(20mM Tris-酢酸 (pH7.5)、20mM NaCl、15mM β-メルカプトエタノール、3mM MgCl₂、0.5mM PMSF)で平衡化されたADP-アガロースカラム(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)にかけた。カラムを、0.5M NaClを含む結合緩衝液Bで洗浄し、5mM ADPを含む緩衝液Bと共に室温で30分間インキュベートした。その後、タンパク質を同じ緩衝液(約5倍のカラム体積)で溶出した。溶出物をMono Qカ

ラムを用いてFPLC装置で分離し、20～500mM NaCl勾配により溶出した。Grp78は、200mMから400mM塩の間に溶出された画分に存在した。肝臓からHspまたはGrpを精製するため、100,000g上清を、最初に、ブルーセファロス(blue sepharose)カラム(Pharmacia)にアブライして、アルブミンを除去した。全タンパク質をブラッドフォード法(BioRad, Richmond, CA)で定量し、SDS-PAGE、次いで、Streng Gen Biotechnologies Corp. (Victoria, BC, Canada)から入手したgrp78に対する抗体を用いたイムノブロットイングにより分析した。

【 0 1 2 3 】

結果

タンパク質hsp110、grp170、およびgrp78は腫瘍および肝臓から共に精製された。これら3つのタンパク質の均一な調製物が得られ、イムノブロットイングによりそれぞれの抗体に認識された。タンパク質の純度をSDS-PAGEおよび銀染色により評価した(図1)。

【 0 1 2 4 】

実施例2:腫瘍拒絶アッセイ法

本実施例は、腫瘍由来hsp110およびgrp170による免疫化が腫瘍抗原投与からマウスを保護することを証明する。この結果は、予防免疫による腫瘍増殖の遅延ならびに治療的免疫化による生存期間の延長を示す。

【 0 1 2 5 】

材料および方法

BALB/cJマウス(ウイルス抗原を含まない)をジャクソン研究所(Jackson Laboratory) (Bar Harbor, ME)から入手し、ロズウェルパーク癌研究所(Roswell Park Cancer Institute)にあるマウス施設で飼育した。メチルコレントレンにより誘発された線維肉腫(MethA)をプラモンド(Pramond) K.スリバスタヴァ(Srivastava)博士(コネチカット大学医学部(University of Connecticut School of Medicine), Farmington, Connecticut)から入手し、毎週200万個の細胞を継代することによりBALB/cJマウスからの腹水中で維持した。

【 0 1 2 6 】

マウス(6～8週齢の雌:1群当たり5匹のマウス)をPBSで免疫化するか、または腫

瘍もしくは肝臓に由来する様々な量のhsp110もしくはgrp170をPBS 200 μ lに溶解して免疫化し、7日後に追加免疫した。最後の免疫化の7日後、マウスの右側腹部に、2 \times 10⁴個のcolon26腫瘍細胞(生存率>99%)を皮下注射した。colon26腫瘍は、非常に治療抵抗性であるマウス腫瘍モデルの良い例である。他の実験において、第2の免疫化の7日後にマウスをMethA腫瘍細胞の皮内注射により抗原投与した。2方向の径を測定することにより、腫瘍増殖をモニターした。

【 0 1 2 7 】

結果

hsp110およびgrp170によるワクチン接種の結果を、それぞれ、図2Aおよび図2Bに示す。PBSおよび肝臓由来hsp110またはgrp170で免疫化されたマウスは全て急速に増殖する腫瘍を発生した。対照的に、腫瘍由来hsp110およびgrp170で免疫化されたマウスは、著しい腫瘍増殖の遅延を示した。従って、腫瘍タンパク質と複合体化されたhsp110またはgrp170は腫瘍増殖を著しく阻害する。

【 0 1 2 8 】

この阻害効果は、腫瘍由来hsp110またはgrp170の用量に直接依存している。(注射1回当たり)20 μ gのhsp110またはgrp170で免疫化されたマウスは、colon26腫瘍増殖の阻害をわずかに示したか、または全く示さなかったのに対して、40 μ gまたは60 μ gのhsp110またはgrp170で免疫化されたマウスは、ますます著しい腫瘍増殖の遅延を示した。検査をしたそれぞれの日で(抗原投与の15、21、27日後)、40 μ gおよび60 μ gの用量のhsp110およびgrp170で免疫化されたマウスにおいて発生した腫瘍の平均体積は対照マウスのものより著しく小さかった($p < 0.01$ 、スチューデントt検定)。しかしながら、PBSまたは肝臓由来hsp調製物を注射された群の平均体積の差は統計的に有意性に達しなかった。

【 0 1 2 9 】

さらに多量の腫瘍細胞(50,000個および100,000個)でマウスを抗原投与することにより、さらなる腫瘍拒絶アッセイ法を行った。同様の阻害結果が腫瘍由来hsp110またはgrp170について得られたが、予想通り、これらの腫瘍はさらに急速に増殖した。grp170はconA-セファロースカラムにより精製されたが、防御免疫が腫瘍に由来するgrp170調製物で免疫化されたマウスでのみ観察され、正常肝臓組

織に由来するgrp170調製物で免疫化されたマウスでは観察されなかったもので、conAによる汚染は除外することができる。

【 0 1 3 0 】

等モル量で、grp170はhsp110より免疫原性があるように見える。grp78の免疫原性も40 μ gのタンパク質を注射することにより試験したが、腫瘍増殖の遅延は観察されなかった。この結果は、grp78には免疫原性がないか、または低いレベルでしか免疫原性がないことを示している。

【 0 1 3 1 】

これらの観察の一般性を他の系において試験するために、hsp110およびgrp170の免疫原性を、メチルコレラトレンにより誘発された(MethA)線維肉腫において試験した。colon26腫瘍モデルでの免疫化データに基づいて、マウスを40 μ gのhsp110またはgrp170で2回免疫化し、皮内注射により導入された100,000個のMethA細胞で抗原投与した。

【 0 1 3 2 】

図4A～図4Cの折れ線図は、それぞれ個々の動物における腫瘍増殖の速度論を示す。免疫化に反応した腫瘍増殖の注目に値する個体間差がgrp170群で観察された。PBSで免疫化されたマウスはMethA腫瘍を発生した(図4A)。しかしながら、hsp110(図4B)またはgrp170(図4C)で免疫化されたマウスは保護された。ほとんどの動物は初期に腫瘍を発生したが、その後、腫瘍は消失した。grp170で免疫化されたマウスにおいて、5匹のマウスのうち2匹が触診可能な腫瘍を完全に発生しなかった(図4C)。

【 0 1 3 3 】

治療的免疫化

進行性のcolon26腫瘍をまた治療モデルにおいて調べた。腫瘍細胞(500,000個)を側腹部に注射し、腫瘍が目に見え触診可能になった時(例えば、6日目)から、マウス(1群当たり10匹)に、肝臓またはcolon26由来hsp110またはgrp170を2回(7日空けて)ワクチン接種した。マウスの生存を、様々な時点での腫瘍抗原投与後に生残しているマウスのパーセントとして記録した。

【 0 1 3 4 】

結果を図3Aおよび図3Bに示す。腫瘍由来 (autologus) の hsp110 (図3A) または grp170 (図3B) 調製物で処置された、腫瘍を有するマウスは、未処置マウスまたは肝臓由来 hsp110 もしくは grp170 で免疫化されたマウスと比較して、著しく長い生存期間を示した。対照動物は全て30日以内に死んだが、各群の約半分が40日まで生存し、grp170 で処置されたマウスの20%が60日まで生存した。これらの結果は腫瘍拒絶アッセイ法から得られたデータと一致し、grp170 および hsp110 が有効な抗癌ワクチンであることを再度示している。これらのデータはまた、grp170 が、等モルで、これらの2種類のタンパク質のうちより有効なタンパク質であるように見えることを示している。

【 0 1 3 5 】

実施例3: CTL アッセイ法

抗腫瘍効果の媒介に細胞性免疫が重要であるように思われるので、腫瘍由来 hsp110 または grp170 調製物が CD8+T 細胞反応を誘発する能力を分析するために、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) アッセイ法を行った。この結果は、腫瘍由来 hsp110 または grp170 によるワクチン接種が有効な腫瘍特異的 CTL 反応を誘発することを示す。

【 0 1 3 6 】

材料および方法

前記のようにマウスを2回免疫化した。第2の免疫化の10日後に脾臓を取り出し、脾細胞 (1×10^7 個) を、7日間の免疫化に用いられた放射線照射された腫瘍細胞 (5×10^5 個) との混合リンパ球腫瘍培養 (MLTC) (10% FCS, 1% ペニシリン/ストربتマイシン、1mM ビルビン酸ナトリウム、および $50 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノールを添加) において共培養した。次いで、脾細胞をフイコールパーク (Ficoll-Paque) (Pharmacia) 密度遠心分離により精製し、エフエクター細胞として用いた。細胞により媒介される溶解を、標準的な ^{51}Cr 遊離アッセイ法を用いてインビトロで測定した。簡単に述べると、エフエクター細胞を、50:1、25:1、12.5:1、および 6.25:1 の様々なエフエクター:標的比を用いて、V底96ウェルプレート (Costar, Cambridge, MA) 中で3回繰り返して系列希釈した。標的細胞 (5×10^6 個) を、 $100 \mu\text{Ci}$ のクロム酸 [^{51}Cr] ナトリウムを用いて 37°C で1~2時間標識した。 ^{51}Cr で標識された腫

瘍細胞(5,000個)を添加して、最終体積200 μ l/ウェルにした。

【0137】

標的細胞と培地だけを含んでいたウェル、または標的細胞と0.5% TritonX-100だけを含んでいたウェルは、それぞれ自発遊離対照または最大遊離対照としての役割を果たした。37℃および5% CO₂で4時間のインキュベーション後、ガンマカウンタで上清150 μ lの放射能を分析した。特異的溶解率(%)を以下の式:特異的溶解率% = 100 × (実験による遊離 - 自発遊離) / (最大遊離 - 自発遊離)により計算した。自発遊離は最大遊離の<10%であった。

【0138】

結果

図5に示すように、grp170またはhsp110の精製に用いられた腫瘍に対する腫瘍特異的細胞傷害性が観察された。しかしながら、未処置マウスからの細胞は標的細胞を溶解することができなかった。さらに、colon26に由来するhsp110またはgrp170調製物で免疫化されたマウスからの脾細胞は、colon26腫瘍に特異的な溶解を示したが、MethA腫瘍細胞に特異的な溶解を示さなかった。同様に、MethAに由来するhsp110またはgrp170は、MethAに特異的な溶解を示したが、colon26細胞に特異的な溶解を示さなかった。これらの結果は、腫瘍由来hsp110またはgrp170によるワクチン接種が有効な腫瘍特異的CTL反応を誘発することを証明する。

【0139】

実施例4:腫瘍由来タンパク質を投与された樹状細胞によるワクチン接種

本実施例は、抗原提示細胞が、hsp110またはgrp170免疫化により誘発された抗腫瘍反応において役割を果たす能力を証明する。この結果は、樹状細胞(DC)がhsp110またはgrp170シヤペロン化ペプチド(chaperoned peptide)を提示することができるとを示す。さらに、hsp110またはgrp170を投与されたDCによる免疫療法がタンパク質による直接的な免疫化より有効であった。

【0140】

材料および方法

骨髓を四肢の長骨から流し、塩化アンモニウムを用いて骨髓から赤血球を除去した。RPMI-10 10ml (200U/ml (= 20 ng/ml) マウスGM-CSF(R&D System)、10mM HE

PES、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン、50mM 2-メルカプトエタノールを添加)を入れた細菌用ベトリ皿に、白血球をベトリ皿1枚あたり 2×10^6 個でプレインキュベーションした。培地を3日目および6日目に交換した。8日目に、細胞を使用するために回収した。DC調製物の量を細胞表面マーカー分析および形態分析で特徴付けた。DC(1×10^7 /ml)に、腫瘍由来hsp110またはgrp170(200 μ g)を37 $^{\circ}$ Cで3時間投与した。細胞を洗浄し、腹腔内注射のためにPBSに再懸濁した(マウス1匹当たり、 10^6 個の投与されたDCをPBS 100 μ lに懸濁した)。全ての工程を10日後に繰り返した(処置マウス1匹当たり合計2回の免疫化)。第2の免疫化の10日後、マウスをcolon26腫瘍細胞(2×10^4 個)で抗原投与した。

【 0 1 4 1 】

結果

PBSまたは樹状細胞のみを与えたマウスにおいて腫瘍は進行性で増殖した(図6)。しかしながら、腫瘍由来hsp110またはgrp170を投与されたDCで免疫化されたマウスにおいて、腫瘍増殖の著しい遅延が観察された。これらの結果は、hsp110またはgrp170による直接的な免疫化の研究と一致している。タンパク質による直接的な免疫化(タンパク質40 μ gの2回の皮下注射)と、投与されたDC(タンパク質20 μ gを投与された 10^6 個のDC)による免疫化を比較すると、投与されたDCに基づく免疫療法は、直接的な免疫化に基づく免疫療法より有効であり、かつ少ないタンパク質を用いたので、より効率的であることが示唆される。

【 0 1 4 2 】

実施例5:熱処置によるより有効なワクチンの産生

本実施例は、熱処置された腫瘍から精製されたストレスタンパク質が、熱処置されていない腫瘍から精製されたストレスタンパク質より、腫瘍サイズの減少にさらに有効であることを証明する。この効力の増大は、高温でのペプチド結合の改善、ならびに他の熱により誘導される変化を反映している可能性がある。

【 0 1 4 3 】

最初に、マウスの側腹部に、100,000個のcolon26腫瘍細胞を皮下接種した。腫瘍が約1/1cmのサイズに達した後、以前に述べられたようにWBHを行った。簡単に述べると、マウスを、餌、床敷、および水を備える38 $^{\circ}$ Cに予め温めたマイクロア

イソレータージに入れた。次いで、予め温めた新鮮な空気が入ってくる重力対流オーブン (gravity convection oven) (Memmert Model BE500, East Troy, WI) にケージを入れた。39.5℃ (±0.5℃) の核心温度に達するまで、体温を30分毎に1℃徐々に上げた。マウスを6時間オーブン内で維持した。マウスの核心温度を、Electric Laboratory Animal Monitoring system Pocket Scanner (Maywood, NJ) を用いてモニターした。hsp110、grp170、およびhsp70を精製するため、腫瘍を取り出した。免疫化を、前記のように、1週間置いて2回、PBS、40μgの腫瘍由来hsp110、40μgのWBH処置腫瘍由来hsp110、40μgの腫瘍由来hsp110、40μgの腫瘍由来grp170、40μgのWBH処置腫瘍由来grp170、40μgの腫瘍由来hsp70、または40μgのWBH処置腫瘍由来hsp70を用いて行った。次いで、マウスを、20,000個のcolon26腫瘍生細胞で抗原投与した。腫瘍体積(mm³)を、腫瘍抗原投与の0、3、6、9、12、15、18、および21日後に測定した。

【 0 1 4 4 】

結果を図7に示す。腫瘍抗原投与の12日後および15日後で、hsp110およびhsp70で処置された群は両方とも、PBS処置マウスと比較して著しく減少した腫瘍体積を示した。腫瘍抗原投与の15日後までに、WBH処置腫瘍から精製されたhsp110またはhsp70は、熱処置されていない腫瘍から精製されたhsp110またはhsp70と比較して、腫瘍体積の減少に著しく有効であった。しかしながら、15日までに、熱処置されていない腫瘍から精製されたgrp170は、WBH処置腫瘍からのgrp170より有効であった。

【 0 1 4 5 】

これらのデータは、発熱様の暴露が、colon26腫瘍から精製されたこれら2種類の(熱誘導性)hspの抗原提示経路および/またはペプチド結合特性に影響を及ぼすが、熱不感受性grpについては影響を及ぼさない可能性があることを示す。従って、hsp70およびhsp110のワクチン能力は発熱レベルの治療後に著しく高まる。このことは、プロテオソーム活性の上昇、hspのペプチド結合の強化、hspに結合するタンパク質の範囲の変化、または他の要因に起因する可能性がある。hspは8時間のハイパーサーミア暴露の16時間後に精製されたので、この効果は37℃でしばらく維持される。この免疫原性強化につながる要因は、hsp結合ペプチドの抗

原性プロファイルの変化および/または強化に由来する可能性が高い。ハイパーサーミア出現後の安定性は、その後に長時間なお存在する、抗原処理における上流変化(例えば、プロテオソーム活性の刺激)を示唆している。発熱様ハイパーサーミアの別の特徴は、colon26腫瘍における非常に著しいhsp誘導である。従って、調べられたhspの場合、発熱様の加熱はより効率的なワクチンをもたすだけでなく、よりに多くのワクチンをもたす。最後に、ハイパーサーミアに起因する観察されたワクチン効率の上昇がhsp110およびhsc70にだけ見られたことは興味深い。別組のストレス条件(例えば、酸素欠乏および他の還元状態)により調節されるが、熱により調節されないgrp170は、熱によってそのワクチン能力が減少する。

【 0 1 4 6 】

これらの観察に加えて、図7に示すデータは、加熱されていない対照腫瘍(マウス)から精製されたgrp170が、等質量でhsp70またはhsp110(加熱なし)と比較した場合、ワクチン効率において著しく効率的であることを示している。この、hsp110と比較して増大したgrp170の効率はまた前記の研究に反映されている。この比較は、等質量のこれらのタンパク質の投与に基づいており、分子サイズを考慮に入れた場合(すなわち、モルで比較を行った場合)、増大したgrp170の効率はさらに悪化する。第3に、ここで、hsp70は、ワクチン効率がもう一度、等モルではなく等質量で) hsp110とほぼ等しいように見える。

【 0 1 4 7 】

実施例6: Grp170およびHsp110のシヤペロン活性

本実施例は、タンパク質凝集アッセイ法により、grp170およびhsp110がタンパク質のシヤペロンとなり、凝集を妨げることができていることを証明する。この結果は、hsp70について証明された効率(オー(Oh)ら, 1997, J. Biol. Chem. 272:31636-31640)と比較して、増大したgrp170およびhsp110の効率を示す。

【 0 1 4 8 】

レポートータンパク質であるホタルルシフエラーゼの存在下で熱処理をした際に得られる光散乱の増加の抑制により、熱処理により誘導されるタンパク質凝集を妨げるストレスタンパク質の能力を評価した。ルシフエラーゼを、等モル量の

hsp110またはgrp170と共に43℃で30分間インキュベートした。320nmでの光学密度の増加を測定することにより、凝集をモニターした。単独で加熱されたルシフェラーゼの光学密度を100%に設定した。

【 0 1 4 9 】

結果を図8に示す。ルシフェラーゼ単独で観察された100%の凝集と比較して、ルシフェラーゼと1:1モル比のhsp110は凝集を約20%まで抑えた。ルシフェラーゼと1:1モル比のgrp170は約40%の凝集をもたらし、これらは、ルシフェラーゼと1:1モル比のhsp70が70%の凝集をもたらし、オーラ, 1997, J. Biol. Chem. 272:31636-31640により用いられた条件と同じ条件である。従って、grp170およびhsp110は、タンパク質結合および凝集阻止においてhsp70より大きな効率を示す。hsp110のルーブドメインを欠失させた研究(オーラ, 1999, J. Biol. Chem. 272(22):15712-15718)に基づいて、このシャペロン活性効率の増大は、hsp110およびgrp170の両方に見出される、より大きなルーブドメインに起因する可能性が高い。

【 0 1 5 0 】

hsp110およびgrp170は両方ともペプチド結合クレフトを示すように思われる。しかしながら、hsp110およびgrp170はそのC末端ドメインがhsp70とは劇的に異なる。hsp70タンパク質の場合、C末端ドメインはペプチド結合クレフトの蓋として機能するらしく、結合ペプチド/タンパク質の性質および/または会合ペプチド/タンパク質に対する親和性に重大な影響を及ぼす可能性がある。hsp110およびgrp170は両方とも、hsc70と比較して、熱変性タンパク質への結合および熱変性タンパク質の安定化に著しく効率的であるように見える。このことはこれらの構造的な違いを反映し、ストレスタンパク質がワクチンとして機能する能力の一要因であるペプチド結合特性に影響を及ぼす可能性がある。hsp70およびhsp110はワクチン効率がほぼ同じであるが、異なるサブセットのペプチドを結合するのかもしれない。すなわち、hsp110は、hsc70に容易に結合しない抗原エピトープを運ぶ可能性がある。すなわち、hsp70およびhsp110は、異なる(質量)効率とはいかないまでも異なるワクチン能力を示す可能性がある。grp170について同様に論じることができ、これらのストレスタンパク質のモル効率における著しい差は、ペプチド結合親和性が異なること、それぞれのストレスタンパク質ファミリーに

結合されるペプチドの性質が異なること、またはこれら4種類の各ストレスタンパク質群と相互作用する抗原提示細胞の親和性が異なることに起因する可能性がある。この群において最も効率的なワクチンであるgrp170が群の唯一の糖タンパク質であることもまた注目に値する。

【 0 1 5 1 】

実施例7: hsp110とhsp25およびhsp70との相互作用

本実施例は、大きな分子複合体に存在することが発見されたhsp110の天然の相互作用を証明する。イムノプロット分析および共免疫沈降研究により、この複合体の成分として他の2つの熱ショックタンパク質hsp70およびhsp25が同定された。精製されたhsp25、hsp70、およびhsp110はインビトロで調べられた場合、大きな複合体を自発的に形成し、互いと直接相互作用することが観察された。このインビトロ系にルシフェラーゼを添加すると、熱ショック後に、ルシフェラーゼはこのシヤペロン複合体の中に移動することが観察された。2種類のhsp110欠失変異体を調べることにより、hsp110のペプチド結合ドメインがhsp25との相互作用に必要とされるが、hsp70との相互作用には必要とされないことが証明された。hsp110-hsp70-hsp25複合体の潜在的な機能について検討する。

【 0 1 5 2 】

材料および方法

試薬

ウサギ抗hsp110抗体はリーヨーン(Lee-Yoon), Dら, 1995, J. Biol. Chem. 270, 15725-15733により特徴付けられている。アフィニティ精製されたマウス抗hsc70モノクローナル抗体、ウサギ抗マウスhsp25抗体、ラット抗hsp90抗体、およびラット抗TCP-1aモノクローナル抗体、ならびに組換えhsc70およびマウスhsp25は全てStressGen Biotechnological Corp(Victoria, Canada)から入手した。抗His抗体はAmershamから購入した。colon26腫瘍細胞は、5% CO₂ インキュベーター内で、10% ウシ血清を添加したDMEM中で培養した。

【 0 1 5 3 】

プラスミド構築および発現

組換えの、Hisタグ融合された、hsp110およびここで用いた2種類の欠失変異体

の精製は、オ一, H. J. ら, 1997, J. Biol. Chem. 272, 31636-31640およびオ一, H. J. ら, 1997, J. Biol. Chem. 274:15712-15718に記載されている。簡単に述べると、hsp110変異体の構築のために、プライマー

5'-GCTAGAGGATCCTGTGCAATTGCAGTGTGC AATT (配列番号: 1) -/-
CAGCGCAAGCTTACTAGTCCAGGTCATATTGA-3' (配列番号: 2)

(変異体 # 1、アミノ酸375~858) および

5'-GACGACGGATCCTCTGTGCGAGGCAGACATGGA (配列番号: 3) -/-
CAGCGCAAGCTTACTAGTCCAGGTCATATTGA-3' (配列番号: 4)

(変異体 # 2、アミノ酸508~858) をポリメラゼ連鎖反応に用いた。PCR産物をpRSETAベクター (Invitrogen) にクローニングし、His₆-(エンテロキナーゼ認識配列) および追加のAsp-Arg-Trp-Gly-Ser (変異体 # 1用) またはAsp-Arg-Trp (変異体 # 2用) をhsp110変異体のN末端に付加した。プラスミドで大腸菌JM109(DE3) 株を形質転換し、発現産物をNi²⁺-ニトリロ三酢酸-アガロースカラム (QIAGEN, Inc.) により精製した。Bio-Radタンパク質アッセイキットを用いてタンパク質濃度を測定した。

【 0 1 5 4 】

天然hsp110の精製

細胞をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、Teflonホモジナイザーを用いて、5倍体積の緩衝液 (30mM NaHCO₃ (pH7.5)、1mMブツ化フェニルメチルスルホニル) と共にホモジナイズした。ホモジネートを12,000×gで20分間遠心分離し、上清を、100,000×gで2時間さらに遠心分離した。最初に、細胞抽出物をConA-セファロースカラムにアブライし、非結合タンパク質を収集し、20mM Tris-HCl (pH7.5)、200mM NaCl、0.1mMジチオスレイトールで平衡化されたイオン交換カラム (MonoQ, Pharmacia) にかけた。結合タンパク質を直線塩勾配 (200mM~350mM NaCl) で溶出した。プールされたhsp110画分をセントリコン (centricon) 30 (Amicon) を用いて濃縮し、20mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl、1mM DTTで平衡化された高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用サイズ排除カラム (スーパーローヌ6, Pharmacia) にアブライし、次いで、0.2ml/分の流速で溶出した。タンパク質マーカースとして、チログ

ロブリン (669kDa)、フェリチン (440kDa)、カタラーゼ (158kDa)、アルブミン (67kDa)、およびオボアルブミン (43kDa) を用いた。

【 0 1 5 5 】

ウエスタンブロット分析

細胞をPBSで洗浄し、50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、2mM EDTA、1% Triton X-100、およびプロテアーゼ阻害剤中で溶解した。氷上で30分間のインキュベーション後、細胞抽出物を、等量のSDS試料緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH6.8)、5% β -メルカプトエタノール、2% SDS、10% グリセロール) と共に10分間煮沸し、10,000gで20分間遠心分離した。等量のタンパク質試料を7.5~10% SDS-PAGEにかけ、イモビロン (immobilon)-Pメンブレン (Millipore, Ltd., UK) に電気的に移した。メンブレンを、TBST (20mM Tris-HCl (pH7.4)、137mM NaCl、0.05% Tween-20) に溶解した5% 脱脂乳を用いて室温で1時間ブロッッキングし、次いで、TBSTで1:1000に希釈された一次抗体と共に2時間インキュベートした。洗浄後、メンブレンを、TBSTで1:2000に希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgGまたはヤギ抗マウスIgGと共にインキュベートした。化学発光増幅 (Enhanced Chemiluminescence) 検出システム (Amersham, Arlington Heights, IL) を用いて、免疫反応性を検出した。

【 0 1 5 6 】

免疫沈降

細胞を冷PBSで3回洗浄し、緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、2mM EDTA、0.5% デオキシコロール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% NP40、10 μ g/ml ロイペプチン、25 μ g/ml アプロチニン、1mM ABESF、0.025% NaN₃) 中で溶解した。溶解産物を遠心分離し、上清を、プロテインAビーズ30ml と共に0.05倍体積の免疫前血清で1時間、前吸着 (presorb) させた。溶解産物を、hsp110抗体 (1:100) またはhsc70抗体 (1:200) またはhsp25抗体 (1:100) と共に4℃で一晩インキュベートした。シャペロンとの相互作用をインビトロで分析するために、組換え野生型hsp110およびhsp110変異体を、最初に、hsc70またはhsp25と共に30℃でインキュベートした。次いで、hsc70抗体またはhsp25抗体を添加し、4℃で一晩さらにインキュベートした。免疫複合体を、プロテインA-アガロース (30 μ l) で2時間、沈降させた

。沈降物を、50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.1% SDS、0.5% デオキシコ
ール酸ナトリウム、1% NP40で3回洗浄し、SDS試料緩衝液30~40 μ lを添加し、5
分間煮沸した。上清を7.5~12% SDS-PAGEにかけ、イムノブロットティングにより
分析した。

【 0 1 5 7 】

ルシフェラーゼとHSPとの相互作用

25mM Hepes (pH7.9)、5mM 酢酸マグネシウム、50mM KCl、5mM b-メルカプトエタ
ノール、および1mM ATPに溶解したhsp110、hsc70、およびhsp25(各150nM)と共に
、ルシフェラーゼ (Boehringer Mannheim) を室温または43℃で30分間インキュベ
ートした。溶液を16,000gで20分間遠心分離し、20mM Tris-HCl (pH7.8)、150mM N
aCl、および2mM DTTで平衡化されたセファクリル (Sephacryl) S-300カラム (Pharm
acia) に上清を負荷した。タンパク質を、0.24ml/分の流速で、4℃で溶出した。
画分を収集し、ウエスタンブロットティングにより分析した。

【 0 1 5 8 】

結果

hsp110はhsc70およびhsp25を含む大きな複合体として存在する

hsp110の生理学的役割を調べるために、Colon26細胞における天然hsp110の特
徴付けを行った。細胞抽出物を、ConA-セファロースカラムおよびMonoQカラムで
の連続クロマトグラフィーにかけた後、部分的に精製されたhsp110画分をスーパ
ーローズ6サイズ排除カラム (最大分解能5,000kDa) にかけた。ConAおよびイオン
交換により精製されたhsp110画分は、スーパーロースカラムから、200kDa~700k
Daのサイズ範囲の画分に溶出することが観察された (図9A)。セファクリル300 (デ
キストランアリル/ビスアクリルアミドマトリックス) カラムを用いて作業を繰返
し、分析により同様のデータが得られた。

【 0 1 5 9 】

hsp110が高分子量の1本の広いピークとして溶出されたので、この大きなイン
サイテューhsp110複合体がまた、さらなる成分 (潜在的に、他の分子シヤペロン
および/またはhsp110と相互作用し得る細胞基質を含む) を含む可能性があること
は理にかなっている。この可能性を調べるために、イオン交換カラムおよびサイ

ズ排除カラムから得られた精製hsp110画分を、入手可能な抗体を用いる他のHSPのイムノプロットングにより調べた。図9Bに示すように、hsp90、hsc70、T-複合体ポリペプチド1(TCP-1)、およびhsp25に対する抗体を用いた。4種類全てのタンパク質を全細胞溶解産物で容易に検出することができた(レーン1、3、5、および7)。hsp110画分を調べた場合に、TCP-1およびhsp90は観察されなかった(レーン2および6)。しかしながら、hsc70およびhsp25は両方ともhsp110と同時に精製されることが判明し、hsc70の全細胞画分はhsp25の全細胞画分より著しく多かった。サイズ排除カラムからのhsc70およびhsp25のクロマトグラフィープロフィールもまた、hsp110のものと同様のパターンを示した(図9A)。

【 0 1 6 0 】

この同時精製もまたこれら3種類の分子シヤペロン間の相互作用を反映したのか確かめるために、Colon26細胞抽出物およびhsp110画分を用いて、相互的な免疫沈降分析を行った。hsc70およびhsp25は、抗hsp110抗体を用いてhsp110と共に沈降することが示された(図10A)。逆に、hsp110は、抗hsc70抗体または抗hsp25抗体で共沈された(図10Bおよび図10C、上部)。対応する負の結果を伴う陰性対照として免疫沈降を行うために、免疫前血清も用いた。最後に、hsc70とhsp25との相互作用を、hsc70抗体およびhsp25抗体を用いて分析した。もう一度、これらの2種類のタンパク質は互いと共免疫沈降することが観察された(図10Bおよび図10C、下部)。前記の研究から、hsp110、hsc70、およびhsp25はインサイチューで直接的または間接的に相互作用すると結論づけることができる。

【 0 1 6 1 】

インピットロでのhsp110とhsc70およびhsp25との相互作用の分析

hsp110、hsc70、およびhsp25がインピットロで相互作用するか、ならびに精製タンパク質成分を用いることにより高分子量複合体を形成することができるかを確かめるために、この混合物にルシフェラーゼを潜在的な基質として添加した。hsp110は、熱変性後に、このレポータータンパク質を可溶化できることが示されている。ルシフェラーゼを、hsp110、hsc70、およびhsp25混合物と共に(1:1のモル比で)室温または43℃で30分間インキュベートした。可溶性画分をセファクリルS-300カラムにかけ、溶出された画分をSDS-PAGE上で移動させ、hsp110、hsc70、h

sp25、およびルシフェラーゼに対する抗体を用いたイムノブロットイングにより分析した。

【 0 1 6 2 】

この研究の結果を図11Aおよび図11Bに示す。再度、hsp110、hsc70、およびhsp25は高分子量画分に存在することが判明した。しかしながら、これらの画分は、インビボで見られるもの(図11A)より著しく大きな分子サイズで溶出された。さらに、熱処理は、hsp110、hsc70、およびhsp25の溶出パターンを変えないことが分かった。しかしながら、加熱前にhsp110複合体と同時に溶出しなかった(単量体として存在する)ルシフェラーゼは、熱暴露後に高分子量構造に移動すること観察された(図11B)。これらの実験において、ルシフェラーゼのほとんど全てが可溶性形態で維持された。ルシフェラーゼは単独で加熱された場合、急速に不溶性になった。熱ショックは、3種類のhsp110、hsc70、またはhsp25の可溶性に影響を及ぼさなかった。

【 0 1 6 3 】

前記のデータにより、hsp110、hsc70、およびhsp25はインビトロで高分子量構造で同時精製され、同様に、ルシフェラーゼも存在すれば加熱後に同時精製されることが分かる。このことは、これらのタンパク質がどのようにそれら自身と相互作用するか、またはこれはこれらのいずれか2つが相互作用することを全く示していない。しかしながら、加熱されたルシフェラーゼが可溶性のままであることを、これらのシヤペロンの少なくとも1つと相互作用した証拠である。これらのシヤペロンがどのように相互作用するかを確かめるために、共免疫沈降実験を、精製タンパク質の対を用いて再度行った。hsc70およびhsp110はhsp25の非存在下で相互作用することが判明し(図12、レーン1)、それに対応して、hsp110は、hsc70の非存在下でhsp25単独と共に沈降することが観察された(レーン4)。最後に、hsc70およびhsp25はまたhsp110の非存在下で共沈する(レーン8)。

【 0 1 6 4 】

最後に、hsp110シヤペロンの最も単純化した形態(すなわち、機能形態および非機能形態)であることが以前に示されている2種類のhsp110欠変異体(オー、H. J.ら, 1999, J. Biol. Chem. 274:15712-15718)を調べることにより、hsp110、hsc70

、およびhsp25間の相互作用を明らかにするこのインビトロ研究を展開した。調べられた第1の変異体(#1)は、hsp110のN末端ATP結合ドメインを欠いているが、残りの配列(すなわち、隣接するβシートペプチド結合ドメインおよび他のC末端配列)を含む(サイズ:75kDaおよびアミノ酸375~858を含む)。この変異体は、フォールディング可能な状態に熱変性ルシフエラーゼを安定化する能力において十分に機能的であることが示されている。ここで用いられた第2の変異体(#2)は、ATP結合ドメインならびに隣接するβシート(ペプチド結合)ドメインを欠いているが、残りのC末端配列を含んでいた(サイズ:62kDaおよびアミノ酸508~858を含む)。最近、この変異体は、熱変性ルシフエラーゼを可溶性状態に維持するシャペロン機能を遂行できないことが示されている。

【 0 1 6 5 】

変異体#1(ATP結合ドメインなし)は、hsp70(レーン2)およびhsp25(レーン5)の両方と共沈することが観察された。このことから、これらの相互作用はATP結合ドメインを必要としないことが分かる。しかしながら、変異体#2(hsp110のATP領域およびペプチド結合領域の両方を欠く)はhsp70とだけ会合することが観察された(レーン3)。このことから、hsp25およびhsp70は異なる部位でhsp110と相互作用することができ、hsp110とhsp25との会合にはhsp110のペプチド結合ドメインが必要であることが分かる。

【 0 1 6 6 】

考察

本実施例は、Colon26細胞におけるhsp110の天然の相互作用の研究について述べる。この結果から、hsp110はhsc70およびhsp25と同時に精製されること、さらに、これら3種類のタンパク質を共免疫沈降できることが分かる。共免疫沈降の結果はこれらのシャペロン間の直接的な相互作用を反映している可能性があることとを確かめるために、また、これらの相互作用を明確にするために、精製されたhsp110、hsc70、およびhsp25を用いてインビトロ研究を行った。これら3種類のシャペロンはまたインビトロで大きな分子複合体を自発的に形成することが判明した。さらに、この複合体は添加基質の非存在下で形成するが、熱ストレスによって、基質(ルシフエラーゼ)を複合体内に移動するように誘導することができる

【 0 1 6 7 】

これらのタンパク質の各対(すなわち、hsc70とhsp110、hsc70とhsp25、およびhsp110とhsp25)は直接的に相互作用できることも分かった。このことと、細胞溶解産物から得られた共沈データから、これらの相互作用はインサイチューで自然に起こることが強く示される。さらに、2種類のhsp110欠変異体を用いることにより、hsp110のペプチド結合ドメインはhsp25結合に必要とされるが、hsc70結合には必要とされず、hsp110のATP結合ドメインは、hsc70との相互作用にもhsp25との相互作用にも必要とされないことが証明された。このことから、hsp110はそのペプチド結合ドメインを介してhsp25に結合することが示唆される。hsc70-hsp110結合がhsp110ペプチド結合ドメインの非存在下で起こることから、hsc70はその(すなわちhsc70の)ペプチド結合ドメインを介してhsp110に能動的に結合している可能性があることが示唆されるが、この2つのタンパク質が他のC末端ドメインの関与によって相互作用する可能性はなくならない。

【 0 1 6 8 】

これらのhsp110とhsc70との相互作用は、これらのタンパク質が協同的に機能することのできる方法に関する可能性を提起する。hsc70およびhsp110のペプチド結合ドメインは、シヤペロン機能の遂行における、これらのシヤペロンの「実働部隊(business end)」に相当すると思われるので、これらのペプチド結合ドメインは基質と能動的に会合するが、互いに会合しないことが予想される。このことは、この複合体が細胞の要求を待ち受けるシヤペロン「収納区画(storage compartment)」に相当するという可能性を提起する。しかしながら、熱ショック後に熱変性ルシフェラーゼがこの画分に移動することは、この複合体それ自体に能動的なシヤペロン活性があることを示している。基質をhsp110からhsc70に移動させて、その後にDnaJホモログおよび他のシヤペロンと連携してフォールディングを行うように、hsc70はhsp110を上のにのせている可能性がある。

【 0 1 6 9 】

hsp110は、hsc70と同様に(オ一, H. J. ら, 1997, J. Biol. Chem. 272:31636-31640; オ一, H. J. ら, 1999, J. Biol. Chem. 274:15712-15718)、DnaJコシヤペロン(co-chape

ron)と連携したフォールディング機能を有することがまだ示されていない。しかしながら、hsp110はhsp70とは異なるATP結合特性を示し、hsp110の可能性のあるコシヤペロンが発見される可能性がある。以前のインビトロ研究から、sHSP(例えば、hsp25)は非天然タンパク質を結合するが、リフォールディングにはhsp70の存在が依然として必要とされることが証明されている(リー(Lee), G. J. ら, 1997, EMBO J. 16, 659-671; ヤコブ(Jakob), U. ら, 1993, J. Biol. Chem. 268, 7414-7421; メルク(Merck), K. B. ら, 1993, J. Biol. Chem. 268, 1046-1052; カンペンガ(Kampinga), H. ら, 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, 170-177; エルンスパーガー(Ehrnsperger), M. ら, 1997, EMBO J. 16, 221-229)。hsp110およびsHSPは、シヤペロン機構を含むhsp70-DnaJへの後の往復(shuttling)のために、広範囲の様々な基質の特異的な結合に作用する可能性がある。

【 0 1 7 0 】

これら3種類のシヤペロンが相互作用することは一般的な現象を示している可能性がある。最近、プレソフスキ・ビグ(Plesofsky-Vig)およびブランブル(Brambl)は、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)の小HSP(hsp30と呼ばれる)が2種類の細胞タンパク質hsp70およびhsp88に結合することを示した。hsp88のクロニングおよび分析から、hsp88はアカパンカビのhsp110に相当することが分かった(プレソフスキ・ビグ, N. およびブランブル, R., 1998, J. Biol. Chem. 273, 11335-11341)。このことから、ここで述べた相互作用は系統的に保存されていることが示唆される。さらに、ハタヤマ(Hatayama)は、FM3A細胞におけるhsp110(hsp105と呼ばれる)とhsp70との相互作用について述べている(ハタヤマ, T. ら, 1998, Biochem. Biophys. Res. Comm. 248, 394-401)。本実施例で観察されたhsp110複合体のサイズおよびhsc70との相互作用(これもさならなるイオン交換クロマトグラフィー段階を用いた)は、この最近の報告と明らかに似ており、非常によく一致している。最後に、ステロイドホルモン受容体におけるhsc70および他のタンパク質との会合が以前に確認されたにもかかわらず、本研究ではhsp90およびTCP-1はhsp110複合体において観察されなかった。しかしながら、最近、hsp110ファミリーの酵母の構成要員をコードするSSE1は糖質コルチコイド受容体の機能に必要とされ、hsp90と物理的に会合していることが示された(リウ(Liu), X. D. ら, 1999, J. Biol. Chem.

274, 26654-26660)。

【 0 1 7 1 】

本実施例で示したデータから、この複合体は、より多種多様な基質タンパク質をフォールディング可能な状態に保つ、および/またはより効率的に基質タンパク質をフォールディング可能な状態に保つ、改善した能力をもたすことが示唆される。この結果から、さらなるシヤペロンの存在下で変性タンパク質をリフォールディングするために獲得された改善した能力があり得ることがさらに示唆される。

【 0 1 7 2 】

実施例8: ストレスボリペプチド複合体のインビトロ形成および安定性

本実施例は、ストレスボリペプチドと免疫原性ボリペプチドの複合体がインビトロで生成でき、このような複合体が凍結融解後に安定なままであることを証明する。さらに、hsp110およびgrp170は両方とも、異なるペプチド(癌および感染症と関連する抗原を含む)と複合体を形成することができる。

【 0 1 7 3 】

図13は、インビトロで結合複合体を形成した後の、抗hsp110抗体および抗grp170抗体を用いたher-2/neu細胞内ドメイン(ICD)免疫沈降の結果を示す。レーン1は205kDa~7.4kDaのタンパク質標準である。レーン2はhsp110+抗hsp110抗体である。レーン3はhsp110+ICDである。レーン4はgrp170+ICD(結合緩衝液に溶解)である。レーン5はgrp170+ICD(PBSに溶解)である。レーン6はICDである。レーン7はhsp110である。

【 0 1 7 4 】

図14は、抗hsp110抗体を用いた複合体免疫沈降後の、新鮮な試料(左レーン)および凍結融解試料(中央レーン)におけるhsp110-ICD複合体を示すウエスタンブロットである。右レーンはICDである、これらの結果から、hsp110-ICD複合体は凍結融解後に安定であることが分かる。

【 0 1 7 5 】

図15は、改良ELISAおよびp546(HLA-A2結合親和性およびhsp110に対する予想される結合のために選択された、her-2/neu膜貫通ドメインの10merペプチド

(VLQGLPREYV ; 配列番号 : 5)

を用いた、hsp-ペプチド結合を示す棒グラフである。このペプチドをピオチン化し、インビトロでhsp110と混合した(PBS 150 μ l中、ペプチド 60 μ gおよびhsp110 60 μ g)。混合物を43℃で30分間、次いで、37℃で1時間インキユベートした。混合物を、セントリコン-10遠心分離機を用いて精製して、非結合ペプチドを除去した。BSA(1%)もまたピオチン化ペプチド100 μ gと共に同じ条件下でインキユベートし、精製した。ウエルを、コーティング緩衝液に溶解した異なる濃度の精製混合物、ピオチン化ペプチド(陽性対照)、またはBSA(陰性対照)でコーティングした。4℃で一晩のインキユベーション後、ウエルをPBS-Tween20(0.05%)で3回洗浄し、PBSに溶解した1%BSAを用いて室温で1時間ブロッキングした。洗浄後、1:1000ストアプトアピジン-HRPをウエルに添加し、プレートを室温で1時間インキユベートした。TMB基質を添加することにより発色させ、450nmでの吸光度を読み取った。精製混合物の濃度は、1 μ g/ml(白い棒)、10 μ g/ml(斜交平行線の棒)、および100 μ g/ml(濃い点描の棒)であった。

【 0 1 7 6 】

図16は、新鮮な試料および凍結融解されている試料を用いて、インビトロで結合複合体を形成した後の、抗hsp110抗体を用いたヒト型結核菌抗原Mtb8.4およびMtb39免疫沈降の結果を示す。レーン1は205kDa~7.4kDaのタンパク質標準である。レーン2はhsp110+Mtb8.4である。レーン3はhsp110+Mtb8.4(凍結融解後)である。レーン4はMtb8.4である。レーン5はhsp110である。レーン6はhsp110+Mtb39である。レーン7はhsp110+Mtb39(凍結融解後)である。レーン8はMtb39である。レーン9は抗hsp110抗体である。

【 0 1 7 7 】

実施例9: ストレスボリペプチド複合体は細胞性免疫反応を誘発する

本実施例は、her-2/neuに由来するペプチド(her-2/neuの細胞内ドメイン(ICD); アミノ酸残基676~1255)、細胞外ドメイン

(ECD; p369; KIFGSLAFL; 配列番号: 6)

、または膜貫通領域(p546)を含む)と複合体化されたhsp110が、刺激されたCTLによる γ -インターフェロン(IFN- γ)産生により測定されるように免疫原性であることを証明する。このデータから、ICDと複合体化されたhsp110は、her-2/neuの他のペプチドと複合体化されたhsp110より強いCTL反応を生じることが分かる。

【 0 1 7 8 】

図17は、組換えマウス'hsp110-ICD複合体25 μ gを用いた腹腔内免疫後のA2/Kbトランスジェニックマウス(1群当たり5匹の動物)のT細胞によるIFN- γ 産生(ELISPO Tアッセイ法でのスポットの数により測定される)を示す棒グラフである。これらのマウスは、HLA-A2提示が可能であり、ならびにマウスポリ α 3ドメインを保持し、さらなる細胞表面タンパク質相互作用をもたらずように、ハイブリッドヒト/マウスクラスI分子の遺伝子が導入されている。2週間後に動物を追加免疫し、その2週間後に屠殺した。対照群は25 μ gのICDもしくはhsp110を注射されたか、または免疫化されなかった。抗CD8抗体でコーティングしたダイナビーズ(Dynabeads)および磁気分離を用いてCD8⁺ T細胞を枯渇させた。総脾細胞または枯渇した細胞(5×10^6 細胞/ml)を25 μ g/ml PHA(チエックの棒)または20 μ g/ml ICD(濃い点描の棒)と共にインビトロで一晩培養し、ELISPO Tアッセイ法を用いてIFN- γ 分泌を検出した。

【 0 1 7 9 】

図18は、インビトロで再構成されたhsp110-ペプチド複合体の免疫原性(IFN- γ 分泌用ELISPO Tアッセイ法での陽性スポットの数により測定される)を示す棒グラフである。組換えハムスターhsp110(100 μ g)を、HLA-A2結合剤である9mer her-2/neuペプチドp369(100 μ g)と共に43℃で30分間インキュベートし、その後、室温で60分間インキュベートした。この複合体を、セントリコン-10遠心分離機を用いて精製して、非結合ペプチドを除去した。8週齢のHLA-A2トランスジェニックマウス(n=4)を、PBS 200 μ lに溶解した60 μ gのhsp110+ペプチド複合体(群A、斜交平行線の棒)またはペプチドのみ(群B、濃い点描の棒)で腹腔内免疫し、2週間後に追加免疫した。最後の注射の2週間後に、動物を屠殺した。PHA(陽性対照)、免疫用ペプチド、またはhsp110を15U/mlのヒト組換えIL-2と共に添加した時に、動物の脾細胞(10^7 細胞/ml)が、PHA(陽性対照)、免疫用ペプチド、またはhsp110

によりインビトロで刺激された。非刺激細胞(陰性対照)のカウントは <40 であり、刺激細胞のカウントから引かれた。

【 0 1 8 0 】

図19は、インビトロで再構成されたhsp110-ペプチド複合体の免疫原性(IFN- γ 分泌用ELISPOTアッセイ法での陽性スポットの数により測定される)を示す棒グラフである。組換えハムスターhsp110(100 μ g)を、HLA-A2結合剤である10mer her-2/neuペプチドp546(100 μ g)と共に43℃で30分間インキュベートし、その後、室温で60分間インキュベートした。この複合体を、セントリコン-10遠心分離機を用いて精製して、非結合ペプチドを除去した。8週齢のHLA-A2トランスジェニックスマウス(n=2)を、PBS 200 μ lに溶解した60 μ gのhsp110+ペプチド複合体(群A、斜交平行線の棒)またはペプチドのみ(群B、濃い点描の棒)で腹腔内免疫し、2週間後に追加免疫した。最後の注射の2週間後に動物を屠殺した。PHA(陽性対照)、免疫用ペプチド、またはhsp110を15U/mlのヒト組換えIL-2と共に添加した時に、動物の脾細胞(10⁷細胞/ml)が、PHA(陽性対照)、免疫用ペプチド、またはhsp110によりインビトロで刺激された。非刺激細胞(陰性対照)のカウントは <40 であり、刺激細胞のカウントから引かれた。

【 0 1 8 1 】

実施例10: ストレスポリペプチド複合体は特異的抗体反応を誘発する

本実施例は、A2/Kbトランスジェニックスマウスにおけるhsp110-her-2/neu ICD複合体による免疫化が抗体反応を誘発することを証明する。この反応は特異的であり、her-2/neu ICDのみの投与により起こる反応より著しく大きい。従って、本発明のストレスタンパク質複合体は、細胞性免疫および体液性免疫の両方を刺激することができる。

【 0 1 8 2 】

図20は、hsp110-ICD(her-2/neu)複合体で腹腔内免疫した後の、A2/Kbトランスジェニックスマウスにおける特異的な抗hsp110抗体反応を示すグラフである。血清および抗体の希釈の関数として、ELISA結果を450nmでの光学密度(OD)としてプロットした。抗hsp110の陽性対照(黒四角)、非関連抗体の陰性対照(白丸)、ならびに0日目(黒丸)、14日目(白四角、点線)、および28日目(白四角、実線)の血清に

ついでの結果を示す。これらの結果から、マウスはhsp110に対する自己免疫反応を起さなっただことが確認される。

【 0 1 8 3 】

図 21 は、hsp110-ICD複合体で腹腔内免疫した後の、A2/Kbトランスジェニックマウスにおける特異的な抗ICD抗体反応を示すグラフである。血清および抗体の希釈の関数として、ELISA結果を450nmでの光学密度(OD)としてプロットした。抗ICDの陽性対照(黒四角)、非関連抗体の陰性対照(白菱形)、ならびに0日目(黒丸)、14日目(白四角、点線)、および28日目(白四角、実線)の血清についての結果を示す。これらの結果から、マウスは、ストレスタンパク質複合体による免疫化の後に、her-2/neuのICDに対する特異的な抗体反応を起こしたことが確認される。

【 0 1 8 4 】

図 22 は、異なるワクチン処方で初回刺激した2週間後の、A2/Kbトランスジェニック動物における特異的な抗ICD抗体反応を比較した棒グラフである。結果を、血清および抗体の様々な希釈に対する450nmでのODとしてプロットした。棒は、hsp110-ICD(点描の棒)、完全フロイントアジュバントに溶解したICDの陽性対照(CFA; チエックの棒)、ICDのみ(斜交平行線の棒)で初回刺激された動物、抗ICD抗体(濃い点描の棒)、および非関連抗体の陰性対照(白い棒)のデータを示す。

【 0 1 8 5 】

図 23 は、hsp110-ICD複合体を用いてA2/Kbトランスジェニックを皮下初回刺激または腹腔内初回刺激した2週間後の、特異的な抗ICD抗体の生成を比較した棒グラフである。結果を、血清および抗体の様々な希釈に対する450nmでのODとしてプロットした。棒は、0日目での血清(点描の棒)、14日目での血清(腹腔内)(チエックの棒)、14日目での血清(皮下)(斜交平行線の棒)、抗ICD抗体(濃い点描の棒)、および非関連抗体の陰性対照(白い棒)を示す。

【 0 1 8 6 】

実施例 11: Hsp110ペクターでトランスフェクトされた腫瘍細胞はHsp110を過剰発

現する

本実施例は、hsp110をコードするペクターでトランスフェクトされたcolon26細胞(CT26)(CT26-hsp110細胞)を特徴付けたデータを示す。これらのCT26-hsp110

細胞は、イムノプロットおよび免疫蛍光染色により証明されるようにhsp110を過剰発現する。

【 0 1 8 7 】

図 24Aは、CT26-hsp110細胞のhsp110発現が、トランスフェクトされていないCT26細胞および空のベクターでトランスフェクトされたCT26細胞(CT26-ベクター)と比較して増加していることを示すイムノプロットである。CT26(レーン1)、CT26-ベクター(レーン2)、およびCT26-hsp110(レーン3)からの等量のタンパク質試料を10% SDS PAGE にかけて、イモビロン-Pメンブレンに移した。メンブレンをhsp110抗体でプロービングした。洗浄後、メンブレンを、TBSTで1:2,000に希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgGまたはヤギ抗マウスIgGと共にインキュベートした。化学発光増幅検出システムを用いて、免疫反応性を検出した。

【 0 1 8 8 】

図 24Bは、CT26-hsp110細胞のhsc70発現が、トランスフェクトされていないCT26細胞または空のベクターでトランスフェクトされたCT26細胞と比較して増加していないことを示す。メンブレンをhsc/hsp70抗体でプロービングした以外は図24と同様に、CT26(レーン1)、CT26-ベクター(レーン2)、およびCT26-hsp110(レーン3)からの等量のタンパク質試料を調製した。

【 0 1 8 9 】

図 25Aは、CT26細胞におけるhsp110の免疫蛍光染色を示す顕微鏡写真である。染色の前日に細胞をカバークラスに播種した。次いで、カバークラスをウサギ抗hsp110抗体(1:500希釈)と共にインキュベートし、その後、FITC標識イヌ抗ウサギIgG染色を行った。正常ウサギIgGを陰性対照として用いた。

【 0 1 9 0 】

図 25Bは、空のベクターでトランスフェクトされたCT26細胞におけるhsp110の免疫蛍光染色を示す顕微鏡写真である。図 25Aと同様に細胞を調製し、免疫染色した。

【 0 1 9 1 】

図 25Cは、hsp110過剰発現細胞におけるhsp110の免疫蛍光染色を示す顕微鏡写

真である。図25Aと同様に細胞に細胞を調製し免疫染色した。

【0192】

実施例12: Hsp110を過剰発現する腫瘍細胞の増殖特性

本実施例は、CT26-hsp110細胞のインビボおよびインビトロ増殖特性を特徴付けるデータを示す。

【0193】

図26は、播種1～5日後の細胞数としてプロットされた、野生型およびhsp110トランスフェクト細胞株のインビトロ増殖特性を示すグラフである。細胞を、 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。24時間後に、細胞をカウントした(0日目と指定した)。示された日に、3個のウェルからの細胞をカウントした。結果は、野生型CT26細胞(丸)、空のベクターでトランスフェクトされたCT26細胞(四角)、およびhsp110トランスフェクトCT26細胞(三角)を用いた3つの独立した実験の平均 \pm SDである。

【0194】

図27は、軟寒天におけるコロニー形成能力に及ぼすhsp110過剰発現の影響を示す棒グラフである。野生型CT26細胞、空のベクターでトランスフェクトされたCT26-ベクター細胞、およびhsp110過剰発現CT26-hsp110細胞を0.3%寒天にプレートイングし、軟寒天においてコロニーを形成する能力(≥ 0.2)について分析した。CT26-ベクターと比較して $P < 0.05$ であった(スチューデントt検定により評価した)。

【0195】

図28は、野生型およびhsp110トランスフェクトCT26細胞株のインビボ増殖特性を示すグラフである。 5×10^4 個の細胞をbalb/cマウスの側腹部に皮下接種した。キヤリパスで縦径および横径を測定して、腫瘍増殖を毎週2回記録した。CT26野生型細胞(丸)、空のベクターでトランスフェクトされたCT26細胞(四角)、hsp110でトランスフェクトされたCT26細胞(5×10^4 個)(上向き三角)、およびhsp110でトランスフェクトされたCT26細胞(5×10^4 個)(下向き三角)についての腫瘍体積(mm³)を腫瘍移植後の日数の関数としてプロットした。

【0196】

実施例13:CT26-Hsp110細胞による免疫化は腫瘍抗原投与から保護する

本実施例は、放射線照射されたhsp110過剰発現CT26細胞で免疫化されたマウスが、CT26生細胞による後の抗原投与から保護されることを証明する。さらに、CT26-hsp110細胞による免疫化は、腫瘍特異的なCTL反応および抗体反応を誘発する。

【 0 1 9 7 】

図29は、CT26生細胞による抗原投与に対する反応に及ぼす、放射線照射されたhsp110過剰発現細胞を注射した影響を示すプロットである。マウスの左側腹部に、 5×10^5 個の放射線照射された(9,000rad)CT26-hsp110細胞を皮下注射した。2週間後、マウスの右側腹部にCT26生細胞を用いて抗原投与した。予備免疫(preimmunization)なしのマウスにおける腫瘍増殖も示した。結果を、腫瘍抗原投与後の日数の関数として、PBSで免疫化され、 5×10^5 個のCT26細胞で抗原投与されたマウス(丸);放射線照射された、空のベクターを有するCT26細胞で免疫化され、 5×10^5 個のCT26細胞で抗原投与されたマウス(四角);放射線照射された、空のベクターを有するCT26細胞で免疫化され、 5×10^5 個のCT26細胞で抗原投与されたマウス(上向き三角);放射線照射されたCT26-hsp110細胞で免疫化され、 5×10^5 個のCT26細胞で抗原投与されたマウス(下向き三角);および放射線照射されたCT26-hsp110細胞で免疫化され、 5×10^5 個のCT26細胞で抗原投与されたマウス(菱形)についての腫瘍の無いマウスのパーセントとしてプロットした。

【 0 1 9 8 】

図30は、腫瘍由来hsp110による免疫化により誘発された腫瘍特異的なCTL反応を示すグラフである。マウスは、 5×10^5 個の放射線照射された(9,000rad)CT26-空のベクターおよびCT26-hsp110細胞を皮下注射した。2週間後、脾細胞をエフェクター細胞として単離し、放射線照射されたColon26を用いてインビトロで5日間、再刺激した。標的細胞として ^{51}Cr 標識Colon26を用いて、リンパ球の細胞傷害活性を分析した。この実験においてMethA腫瘍細胞も標的として用い、細胞溶解は観察されなかった。結果を、エフェクター:標的比の関数として、対照(丸)、放射線照射されたCT26細胞(四角)、および放射線照射されたCT26-hsp110細胞(三角)についての特異的溶解率(%)としてプロットした。

【 0 1 9 9 】

図 31 は、放射線照射された hsp110 過剰発現細胞で免疫化した後の、CT26 細胞に対する抗体反応を示すグラフである。マウスに、 5×10^5 個の放射線照射された ($9,000 \text{ rad}$) CT26-空のベクターおよび CT26-hsp110 細胞を皮下注射した。2週間後、血清を収集し、ELISA を用いて抗体反応についてアッセイした。結果を、血清希釈の関数として、対照 (丸)、CT26-空のベクター (四角)、および CT26-hsp110 (三角) についての 450 nm での OD としてプロットした。

【 0 2 0 0 】

実施例 14: GM-CSF 分泌細胞は CT26-Hsp110 細胞の保護効果を高める

本実施例は、GM-CSF 遺伝子でトランスフェクトされた細胞が CT26-hsp110 細胞と同時に注射された場合、この併用療法で処置された全てのマウスを腫瘍の無いままにする、腫瘍抗原投与に対する保護の強化をもたすことを証明する。

【 0 2 0 1 】

図 32 は、hsp110 過剰発現細胞の増殖に及ぼす、バイスタンダー (bystander) 細胞からの GM-CSF の影響を示すグラフである。マウスに、以下のとおり 5×10^4 個の腫瘍生細胞を皮下注射した: CT26-空のベクター細胞 (丸)、CT26-ベクター細胞 + 放射線照射された B78H1GM-CSF 細胞 (2:1 の比; 四角)、CT26-hsp110 細胞 + 放射線照射された B78H1GM-CSF 細胞 (2:1 の比; 上向き三角)、CT26-hsp110 細胞 (下向き三角)、CT26-hsp110 細胞 + 放射線照射された B78H1 細胞 (2:1 の比; 菱形)。B78H1GM-CSF は、GM-CSF 遺伝子でトランスフェクトされた B16 細胞であるのに対して、B78H1 は野生型細胞である。腫瘍増殖を、腫瘍の大きさを測定することにより記録し、移植後の日数の関数として腫瘍体積 (mm^3) としてプロットした。

【 0 2 0 2 】

図 33 は、野生型 CT26 腫瘍細胞抗原投与に対する反応に及ぼす、放射線照射された hsp110 過剰発現腫瘍ワクチンおよび GM-CSF 分泌バイスタンダー細胞を同時注射した影響を示すグラフである。マウスを、以下のとおり、放射線照射された 5×10^5 個の腫瘍細胞で皮下免疫した: CT26-空のベクター細胞、CT26-ベクター細胞 + B78H1GM-CSF 細胞 (2:1 の比; 四角)、CT26-hsp110 細胞 + B78H1GM-CSF 細胞 (2:1; 上向き三角)、CT26-hsp110 細胞 (下向き三角)、CT26-hsp110 細胞 + B78H1 細胞 (2:1; 菱

形)。PBS(丸)でのみ免疫化されたマウスの結果も示す。マウスを別の部位にCT26野生型細胞で抗原投与し、1日おきに腫瘍発生についてモニターした。結果を、腫瘍抗原投与後の示された日数での、腫瘍の無いマウスのパーセントとしてプロットした。

【 0 2 0 3 】

実施例 15: 腫瘍由来ストレストランスタンパク質複合体による免疫化は細胞性免疫を刺激し、転移性腫瘍増殖を阻害する

本実施例は、本発明の腫瘍由来ストレストランスタンパク質複合体を用いて、細胞性免疫を刺激し、転移性腫瘍増殖を阻害することができることを証明する。インターフェロニン- γ の分泌が、colon26腫瘍由来hsp110およびgrp170ならびにB16F10由来grp170を用いた免疫化により刺激された。B16F10由来grp170による免疫化はまた、腫瘍特異的CTL反応および肺転移の減少を誘発することが示された。

【 0 2 0 4 】

図34は、colon26由来hsp110またはgrp170による免疫化がインターフェロン(IFN) γ の分泌を刺激することを示す棒グラフである。マウスをhsp110またはgrp170で免疫化した1週間後に、ELISPOTアッセイ法のために脾細胞を単離した。フィトヘマグルチニン(PHA)処理リンパ球を陽性対照のために用いた。

【 0 2 0 5 】

図35は、B16F10腫瘍由来grp170を用いた免疫化により誘発された腫瘍特異的CTL反応を示すグラフである。マウスをgrp170(40 μ g)で1週間おきに2回免疫化した。第2の免疫化の1週間後、脾細胞をエフエクター細胞として単離し、放射線照射されたB16F10細胞を用いて5日間インビトロで再刺激した。⁵¹Cr標識されたB16F10細胞またはMethA細胞を標的細胞として用いて、脾細胞の細胞傷害活性を分析した。結果を、エフエクター:標的比の関数として、対照(丸)、肝臓由来grp170(四角)、B16F10由来grp170(上向き三角)、およびMethA由来grp170(下向き三角)についての特異的溶解率(%)としてプロットした。

【 0 2 0 6 】

図36は、B16F10由来grp170による免疫化がIFN- γ 分泌を刺激することを示す。マウスをhsp110またはgrp170で免疫化した1週間後に、ELISPOTアッセイ法のため

に脾細胞を単離した。

【 0 2 0 7 】

図37はマウスの肺転移を示し、ここで、 1×10^5 個のB16F10細胞を、それぞれのC57BL/6マウスの尾静脈に静脈内接種した。腫瘍細胞を注射した24時間後に、マウスをPBS(黒丸)、肝臓由来grp170(白丸)、または腫瘍由来grp170(40 μ g)で処置した。3種類の処置を全実験計画の間に行った。腫瘍注射の3週間後に動物を屠殺し、肺を取り出し、表面コロニーをカウントした。

【 0 2 0 8 】

前記から、本発明の特定の態様が例示のために本明細書で説明されたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更がされ得ることが理解されると思われる。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲によって制限される場合を除いて制限されることはない。

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Corixa Corporation et al.

<120> STRESS PROTEIN COMPOSITIONS AND METHODS
FOR PREVENTION AND TREATMENT OF CANCER AND INFECTIOUS
DISEASE

<130> 126.1WOU3

<150> 60/156,821

<151> 1999-09-30

<150> 60/163,168

<151> 1999-11-02

<150> 60/215,497

<151> 2000-06-30

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

gcctagaggat cctgtgcatt gcagtgctgca att

33

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

cagcgccaggc ttactagtcc aggtccatat tga

33

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

```

<400> 3
gacgacggat cctctgtcga ggcagacatg ga
32
<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 4
cagcgcaagc ttactagtcc aggtccatat tga
33
<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 5
Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
1 5 10
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 6
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

```

【図面の簡単な説明】

【図1 A】 精製されたhspタンパク質の銀染色及び分析を示す。腫瘍由来のhsp110及びhsp70のゲル染色は、各々、レーン1及び2に示す。レーン3及び4は、各々、hsp110抗体及びhsp70抗体によるイムノブロット分析の結果を示す。

【図1 B】 精製されたgrpタンパク質の銀染色及び分析を示し、腫瘍由来のgrp170のゲル染色はレーン1に、肝由来のgrp170のゲル染色はレーン2に、腫瘍由来のgrp78のゲル染色はレーン3に、肝由来のgrp78のゲル染色はレーン4に示す。grp170抗体及びgrp78抗体によるイムノブロット分析の結果は、各々、レーン5～6及び7～8に示す。

【図2 A】 精製したhsp110による免疫化後の腫瘍増殖を示す。腫瘍容積(mm^3)は、PBS(丸)、肝由来のhsp110 $40\mu\text{g}$ (四角)、腫瘍由来のhsp110 $20\mu\text{g}$ (上向き三角)、腫瘍由来のhsp110 $40\mu\text{g}$ (下向き三角)、及び腫瘍由来のhsp110 $60\mu\text{g}$ (菱形)で免疫化されたマウスについて、20,000個のcolon26腫瘍細胞で抗原投与後の日数に対してプロットした。

【図2 B】 精製したgrp170による免疫化後の腫瘍増殖を示す。腫瘍容積(mm^3)は、PBS(丸)、肝由来のgrp170 $40\mu\text{g}$ (四角)、腫瘍由来のgrp170 $20\mu\text{g}$ (上向き三角)、腫瘍由来のgrp170 $40\mu\text{g}$ (下向き三角)、及び腫瘍由来のgrp170 $60\mu\text{g}$ (菱形)で免疫化されたマウスについて、20,000個のcolon26腫瘍細胞で抗原投与後の日数に対してプロットした。

き三角)、腫瘍由来のgrp170 40 μ g(下向き三角)、及び腫瘍由来のgrp170 60 μ g(菱形)で免疫化されたマウスについて、20,000個のcolon26腫瘍細胞で抗原投与後の日数に対してプロットした。

【図3 A】 腫瘍由来のhsp110で免疫化後、colon26腫瘍を生じるBalb/Cマウスの生存を示すプロットである。生存率は、PBS(対照、丸)、肝由来のhsp110 40 μ g(四角)、及び腫瘍由来のhsp110 40 μ g(三角)で免疫化されたマウスへの、腫瘍接種後の日数の関数としてプロットした。

【図3 B】 腫瘍由来のgrp170で免疫化後、colon26腫瘍を生じるBalb/Cマウスの生存を示すプロットである。生存率は、PBS(対照、丸)、肝由来のgrp170 40 μ g(四角)、及び腫瘍由来のgrp170 40 μ g(三角)で免疫化されたマウスへの、腫瘍接種後の日数の関数としてプロットした。

【図4 A】 PBS(対照)で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の関数としての、腫瘍サイズを示すグラフである。個々の線は、動物間の変動を示すための個々のマウスを示す。

【図4 B】 MethAで誘導された腫瘍由来のhsp110で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の関数としての、腫瘍サイズを示すグラフである。個々の線は、動物間の変動を示すための個々のマウスを示す。

【図4 C】 MethAで誘導された腫瘍由来のgrp170で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の関数としての、腫瘍サイズを示すグラフである。個々の線は、動物間の変動を示すための個々のマウスを示す。

【図5 A】 colon26腫瘍細胞を標的化するCTLアッセイ法の結果を示すグラフである。特異的溶解率(%)は、対照T細胞(丸)、colon26腫瘍細胞由来のhsp110に対するT細胞(四角)、及びMethA腫瘍細胞由来のhsp110に対するT細胞についての、エフェクター：標的の比の関数としてプロットした。

【図5 B】 colon26腫瘍細胞を標的化するCTLアッセイ法の結果を示すグラフである。特異的溶解率(%)は、対照T細胞(丸)、colon26腫瘍細胞由来のgrp170に対するT細胞(四角)、及びMethA腫瘍細胞由来のgrp170に対するT細胞についての、エフェクター：標的の比の関数としてプロットした。

【図5 C】 MethA腫瘍細胞を標的化するCTLアッセイ法の結果を示すグラフ

である。特異的溶解率(%)は、対照T細胞(丸)、colon26腫瘍細胞由来のhsp110に対するT細胞(四角)、及びMethA腫瘍細胞由来のhsp110に対するT細胞についての、エフエクター：標的の比の関数としてプロットした。

【図5D】 MethA腫瘍細胞を標的化するCTLアッセイ法の結果を示すグラフである。特異的溶解率(%)は、対照T細胞(丸)、colon26腫瘍細胞由来のgrp170に対するT細胞(四角)、及びMethA腫瘍細胞由来のgrp170に対するT細胞についての、エフエクター：標的の比の関数としてプロットした。

【図6】 grp170によりパルスした樹状細胞(三角)、対照樹状細胞(四角)、又はPBS(丸)で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の関数としての、腫瘍容積(mm³)を示すグラフである。

【図7】 PBS(白丸)、腫瘍由来のgrp170(四角)、全身熱処理したマウスの腫瘍由来のgrp170(上向き三角)、腫瘍由来のhsp110(下向き三角)、全身熱処理したマウスの腫瘍由来のhsp110(菱形)、腫瘍由来のhsp70(六角形)、全身熱処理したマウスの腫瘍由来のhsp70(黒丸)で免疫化したマウスにおける腫瘍抗原投与後の日数の関数としての、腫瘍容積(mm³)を示すグラフである。

【図8】 ルシフェラーゼと共に、hsp110+hsp70+hsp25のモル比1:1:1(四角)、hsp110 1:1(三角)、hsp25 1:1(×)、grp170 1:1(アスタリスク)、又はルシフェラーゼ単独(丸)でのインキュベーションに関する、時間(分)の関数としての、タンパク質凝集率(%) (光散乱により決定)を示すグラフである。

【図9A】 hsp110複合体の特徴決定のためのFPLC用のサイズ排除カラムにより分離された天然のhsp110のクロマトグラム上の連続クロマトグラフィーにより、Con-Aセファロース及びモノQカラムまでの連続クロマトグラフィーにより一部精製した。一緒にした画分は、スーパーローラス6カラムに負荷し、各画分のタンパク質を、hsp110、hsc70、及びhsp25(1:1000)の抗体によるイムノブロッティングにより検出した。

【図9B】 天然のhsp110の組成分析を示すイムノプロットである。精製したhsp110画分は、hsp90(レーン1、2)、hsc70(レーン3、4)、TCP-1(レーン5、6)、及びhsp25(レーン7、8)の抗体により検出した。更に総細胞抽出物を陽性対照(レーン1、3、5、7)として使用した。

【図10A～C】 hsp110及びhsp70、hsp25の間の相反免疫沈降を示すイムノプロットである。同定された抗体とのイムンキユベーション後、プロテインA-セファロースに添加し、かつ更に4℃で一晩イムンキユベーションし、hsp110、hsp70、及びhsp25抗体を用いた免疫沈降により試験した。更に総細胞抽出物を陽性対照(レーン1)として使用した。

【図10A】 細胞溶解液(レーン2)を、hsp110の抗体(1:100)とイムンキユベーションした場合に認められた結果を示す。

【図10B】 細胞溶解液(レーン2)を、hsp70の抗体(1:200)とイムンキユベーションした場合に認められた結果を示す。

【図10C】 細胞溶解液(レーン2)を、hsp25の抗体(1:100)とイムンキユベーションした場合に認められた結果を示す。

【図11A】 ルシフエラーゼ及びHspを室温で30分間イムンキユベーションし、16,000gで遠心分離後、可溶性画分をセファクリルス-300カラムに負荷した場合に調製されたイムノプロットを示す。分離された画分を、Hspの抗体及びルシフエラーゼによるイムノプロットにより分析した。

【図11B】 ルシフエラーゼ及びHspを43℃で30分間イムンキユベーションし、16,000gで遠心分離後、可溶性画分をセファクリルス-300カラムに負荷した場合に調製されたイムノプロットを示す。分離された画分を、Hspの抗体及びルシフエラーゼによるイムノプロットにより分析した。

【図12】 hsp110変異体及びhsp70、hsp25のイムノビトロにおける相互作用分析の結果を示す。完全長hsp110(レーン1、4)及び変異体#1(レーン2、5)、変異体#2(レーン3、6)を発現した大腸菌を、hsc70又はhsp25と共に30℃で1時間イムンキユベーションし、その後、抗hsc70抗体又は抗hsp25抗体を添加した。免疫沈降物を、抗His抗体で検出した。hsc70及びhsp25の間のイムノビトロ相互作用も、前述の方法と同じ方法で検出した；hsc70抗体を使用し、免疫沈降物を試験した(レーン8)。総細胞溶解液を、陽性対照(レーン7)として使用した。各アッセイ法には、野生型hsp110、hsp110変異体、hsc70及びhsp25の同量のタンパク質(2 μ g)が含まれた。

【図13】 her2/neu細胞内ドメイン(ICD)の抗hsp110抗体及び抗grp170抗

体との、インビトロにおける結合複合体形成後の免疫沈降の結果を示す。レーン1は205kDa~7.4kDaのタンパク質標準であり；レーン2はhsp110+抗hsp110抗体であり；レーン3はhsp110+ICDであり；レーン4はgrp170+ICDであり（結合緩衝液中）；レーン5はgrp170+ICD(PBS中)であり；レーン6はICDであり；並びに、レーン7はhsp110である。

【図14】 複合体の抗hsp110抗体との免疫沈降後の、新鮮な試料（左側レーン）及び凍結融解試料（中央レーン）中のhsp110-ICD複合体を示すウエスタンブロットである。右側レーンはICDである。

【図15】 変法ELISA並びにそのHLA-A2結合親和性及びhsp110への予想される結合について選択されたher-2/neuの10-merペプチドであるp546を用いるhsp-ペプチド結合を示す棒グラフである。ペプチドはピオチン化し、かつhsp110とインビトロにおいて混合した。精製した混合物濃度は、 $1\mu\text{g/ml}$ （白い棒）、 $10\mu\text{g/ml}$ （斜交平行線の棒）、及び $100\mu\text{g/ml}$ （黒い点描の棒）であった。

【図16】 新鮮な試料及び凍結融解試料の両方を使用した、ヒト型結核菌抗原Mtb8.4及びMtb39と抗hsp110抗体との、インビトロにおいて結合複合体形成後の免疫沈降の結果を示す。レーン1はタンパク質標準205kDa~7.4kDaであり；レーン2はhsp110+Mtb8.4であり；レーン3はhsp110+Mtb8.4（凍結融解後）であり；レーン4はMtb8.4であり；レーン5はhsp110であり；レーン6はhsp110+Mtb39であり；レーン7はhsp110+Mtb39であり（凍結融解後）；レーン8はMtb39であり；並びに、レーン9は抗hsp110抗体である。

【図17】 A2/Kbトラנסジェニックマウス（1群当たり動物5匹）における、組換えマウスhsp110-ICD複合体 $25\mu\text{g}$ の腹腔内免疫化後の、T細胞による γ インターフェロン（IFN- γ ）産生（ELISPOTアッセイ法におけるスポット数で決定）を示す棒グラフである。総脾細胞又は枯渇した細胞（ 5×10^6 個細胞/ml）を、 $25\mu\text{g/ml}$ I PHA（チエックの棒）又は $20\mu\text{g/ml}$ ICD（黒い点描の棒）と共に、一晚インビトロ培養し、かつIFN- γ 分泌をELISPOTアッセイ法を用いて検出した。

【図18】 IFN- γ 分泌のためのELISPOTアッセイ法における陽性スポット数で決定した、インビトロにおいて再構築されたhsp110-ペプチド複合体の免疫原性を示す棒グラフである。組換えハムスターhsp110（ $100\mu\text{g}$ ）を、 $100\mu\text{g}$ の9-me

r her-2/neuペプチドp369、HLA-A2結合剤と共にインキュベーションした。8週齢のHLA-A2トランスジェニックマウス(n=4)を、hsp110+ペプチド複合体(群A、斜交平行線の棒)又はペプチド単独群(群B、黒い点描の棒)のいずれかで、腹腔内免疫化した。未刺激細胞(陰性対照)の数は、 <40 であり、かつ刺激された細胞数からこれを減じた。

【図19】 IFN- γ 分泌のためのELISPOTアッセイ法における陽性スポット数で決定した、インビトロにおいて再構築されたhsp110-ペプチド複合体の免疫原性を示す棒グラフである。組換えハムスターhsp110(100 μ g)を、100 μ gの10-m her-2/neuペプチドp546、HLA-A2結合剤と共にインキュベーションした。8週齢のHLA-A2トランスジェニックマウス(n=2)を、hsp110+ペプチド複合体(群A、斜交平行線の棒)又はペプチド単独群(群B、黒い点描の棒)のいずれかで、腹腔内免疫化した。未刺激細胞(陰性対照)の数は、 <40 であり、かつ刺激された細胞数からこれを減じた。

【図20】 hsp110-ICD(her2/neu)複合体で腹腔内免疫化したA2/Kbトランスジェニックマウスにおける特異的抗hsp110抗体応答を示すグラフである。ELISAの結果は、血清及び抗体希釈率の閾値として450nmでの光学密度(OD)に対してプロットした。結果は、抗hsp110の陽性対照(黒四角)、非関連抗体の陰性対照(白丸)、及び0日目の血清(黒丸)、14日目(白四角、破線)、及び28日目(白四角、実線)について示した。これらの結果は、マウスがhsp110に対する自己免疫応答を生じていないことを確認している。

【図21】 hsp110-ICD複合体で腹腔内免疫化したA2/Kbトランスジェニックマウスにおける特異的抗ICD抗体応答を示すグラフである。ELISAの結果は、血清及び抗体希釈率の閾値として450nmでの光学密度(OD)に対してプロットした。結果は、抗ICDの陽性対照(黒四角)、非関連抗体の陰性対照(白丸)、及び0日目の血清(黒丸)、14日目(白四角、破線)、及び28日目(白四角、実線)について示した。これらの結果は、マウスが、ストレスタンパク質複合体による免疫化後、her2/neuのICDに対する特異的抗体応答を生じたことを確認している。

【図22】 様々なワクチン製剤で初回刺激して2週間後の、A2/Kbトランスジェニックマウスにおける特異的抗ICD抗体応答を比較する棒グラフである。結

果は、血清及び抗体希釈率の関数として450nmでのODに対してプロットし、かつ棒は、hsp110-ICD(点描の棒)；フロイント完全アジュバント中のICD陽性対照(チエックの棒)、ICD単独(斜交平行線の棒)、抗ICD抗体(濃い点描の棒)、及び非関連抗体の陰性対照(白い棒)で初回刺激した動物のデータを示す。

【図23】 hsp110-ICD複合体でA2/Kbトランスジェニックを皮下又は腹腔内へ初回刺激して2週間後の、特異的抗ICD抗体産生を比較する棒グラフである。結果は、様々な血清及び抗体希釈率の関数として450nmでのODに対してプロットし、かつ棒は、0日目の血清(点描の棒)、腹腔内14日目の血清(チエックの棒)、皮下14日目の血清(斜交平行線の棒)、抗ICD抗体(濃い点描の棒)、及び非関連抗体の陰性対照(白い棒)を示す。

【図24A】 hsp110をコードしているベクターでトランスフェクションされたcolon26細胞(CT26)が、非トランスフェクションCT26細胞及び空のベクターでトランスフェクションされたCT26細胞と比較して、増大したhsp110発現を示すことを示すイムノプロットである。CT26(レーン1)、CT26-ベクター(レーン2)、及びCT26-hsp110(レーン3)からの同等のタンパク質試料に、10% SDS PAGEを行い、かつイモビロン(immobilon)-Pメンブレン上に移した。メンブレンを、hap110に対する抗体でブロッキングした。洗浄後、メンブレンを、TBST中に1:2,000希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼに複合したヤギ抗ウサギIgGまたはヤギ抗マウスIgGと共にインキュベーションした。免疫反応性を化学発光増幅検出システムを用いて検出した。

【図24B】 CT26-hsp110細胞は、非トランスフェクションCT26細胞及び空のベクターでトランスフェクションされたCT26細胞と比較して、増強されたhsc70発現を示さないことを示す。CT26(レーン1)、CT26-ベクター(レーン2)、及びCT26-hsp110(レーン3)からの同等のタンパク質試料は、hsc/hsp70に対する抗体でメンブレンをブロッキングした以外は、図24Aのように調製した。

【図25A】 CT26細胞中のhsp110の免疫蛍光染色を示す、光学顕微鏡写真である。細胞を、染色の1日前に、カバースリップ上に播種した。その後カバースリップを、ウサギ抗hsp110抗体(1:500希釈)と共にインキュベーションし、引き続きFITC標識したイヌ抗ウサギIgG染色した。正常なウサギIgGを陰性対照とし

て使用した。

【図 25B】 空のペクターでトランスフェクションされたCT26細胞中のhsp110の免疫蛍光染色を示す光学顕微鏡写真である。細胞は、図25Aのように調製しかつ免疫染色した。

【図 25C】 hsp110を過剰発現している細胞中のhsp110の免疫蛍光染色を示す光学顕微鏡写真である。細胞は、図25Aのように調製しかつ免疫染色した。

【図 26】 播種後1～5日間の細胞数としてプロットした、野生型及びhsp110によりトランスフェクションされた細胞株のインビトロ増殖特性を表すグラフである。細胞は1ウェルあたり 2×10^4 個の密度で播種した。24時間後、細胞を計数した(0日目に相当)。3つ組のウェルから細胞数を指定した日に計数した。結果は、野生型CT26細胞(丸)、空のペクターでトランスフェクションされたCT26細胞(四角)、及びhsp110-トランスフェクションされたCT26細胞(三角)を用いた3回の独立した実験の平均 \pm SDである。

【図 27】 hsp110の過剰発現の軟寒天中でのコロニー形成能への作用を示す棒グラフである。野生型CT26細胞、空のペクターでトランスフェクションされたCT26-ペクター細胞及びhsp110を過剰発現しているCT26-hsp110細胞を、0.3%寒天中に播種し、かつ軟寒天中でのそれらのコロニー形成能を分析した(≥ 0.2)。スチューデントt検定により解析し、CT26-ペクターと比べ、 $P < 0.05$ であった。

【図 28】 野生型及びhsp110トランスフェクションされた細胞株のインビボ増殖特性を表すグラフである。細胞 5×10^4 個を、balb/cマウスの脇腹領域に皮下接種した。腫瘍増殖を、キヤリパスで縦横両方向の直径を測定し、毎週2回記録した。腫瘍容積(mm^3)を、野生型CT26細胞(丸)、空のペクターでトランスフェクションされたCT26細胞(四角)、hsp110でトランスフェクションされたCT26細胞、 5×10^4 個(上向き三角)、及びhsp110でトランスフェクションされたCT26細胞、 5×10^5 個(下向き三角)について、腫瘍移植後の日数の関数としてプロットした。

【図 29】 放射線照射したhsp110過剰発現細胞の注射の、生存CT26細胞による抗原投与に対する反応への作用を示すプロットである。マウスに、 5×10^5 個の放射線照射した($9,000 \text{ rad}$)CT26-hsp110細胞を、左脇腹に皮下注射した。2週間

後、マウスを、生存CT26細胞で右脇腹に抗原投与した。予備免疫していないマウスにおける腫瘍増殖も示した。結果は、PBSで免疫化しかつ 5×10^4 個のCT26細胞(丸)；空のベクターを伴う放射線照射したCT26細胞/ 5×10^5 個のCT26細胞(四角)；空のベクターを伴う放射線照射したCT26細胞/ 5×10^6 個のCT26細胞(上向き三角)；放射線照射したCT26-hsp110細胞/ 5×10^5 個のCT26細胞(下向き三角)；及び、放射線照射したCT26-hsp110細胞/ 5×10^6 個のCT26細胞(菱形)で抗原投与したマウスについて、腫瘍抗原投与後の日数の関数として、腫瘍を有さないマウスの割合としてプロットした。

【図30】 腫瘍由来のhsp110による免疫化により誘起された腫瘍特異性CTL反応を示すグラフである。マウスに、 5×10^5 個の放射線照射した($9,000\text{rad}$)CT26-空ベクター細胞及びCT26-hsp110細胞を皮下注射した。2週間後、エフエクター細胞として、脾細胞を単離し、かつ放射線照射したcolon26で、インビトロにおいて5日間再刺激した。リンパ球を、 ^{51}Cr -標識したcolon26を標的細胞として用い、細胞傷害性活性について分析した。この実験では、MethA腫瘍細胞も標的として用い、かつ細胞溶解は認められなかった。結果は、対照(丸)、放射線照射したCT26細胞(四角)、及び放射線照射したCT26-hsp110細胞(三角)について、エフエクター：標的比の関数として、特異的溶解率(%)をプロットした。

【図31】 放射線照射したhsp110-過剰発現細胞による免疫化後の、CT26細胞に対する抗体反応を示すグラフである。マウスには、 5×10^5 個の放射線照射した($9,000\text{rad}$)CT26-空ベクター細胞及びCT26-hsp110細胞を皮下注射した。2週間後、血清を収集し、かつELISAを用いて抗体反応をアッセイした。結果は、対照(丸)、CT26-空ベクター(四角)、及びCT26-hsp110(三角)についての血清希釈の関数として、 450nm でのODをプロットした。

【図32】 hsp110過剰発現細胞の増殖に対する、バイスタンダー(bystander)細胞由来のGM-CSFの作用を示している。マウスには、下記の 5×10^4 個の生存腫瘍細胞を皮下注射した：CT26-空ベクター細胞(丸)、CT26-ベクター細胞+放射線照射したB78H1GM-CSF細胞(比2:1；四角)、CT26-hsp110細胞+放射線照射したB78H1GM-CSF細胞(比2:1；上向き三角)；CT26-hsp110細胞(下向き三角)；CT26-hsp110+放射線照射したB78H1細胞(比2:1；菱形)。B78H1GM-CSFは、CM-CSF遺伝子でト

ランスフエクシヨンされたB16細胞であり、B78H1は、野生型細胞である。腫瘍増殖は、腫瘍サイズを測定することにより記録し、かつ移植後の日数の関数としての腫瘍容積(mm³)をプロットした。

【図33】 放射線照射したhsp110を過剰発現している腫瘍ワクチン及びGM-CSFを分泌しているバイスタンダー細胞の同時注射の、野生型CT26腫瘍細胞抗原投与の反応に対する作用を示すグラフである。マウスは、以下のような、放射線照射した 5×10^5 個の腫瘍細胞により皮下に免疫化した：CT26-空のベクター細胞、CT26-ベクター細胞+B78H1GM-CSF細胞(比2:1;四角)、CT26-hsp110細胞+B78H1GM-CSF細胞(比2:1;上向き三角)、CT26-hsp110細胞(下向き三角)、CT26-hsp110+B78H1細胞(2:1;菱形)。更に、PBS(丸)のみで免疫化したマウスについての結果も示す。マウスは、個別の部位を、CT26野生型細胞で抗原投与し、かつ腫瘍出現について1日おきにモニタリングした。結果は、腫瘍抗原投与後の指定日に腫瘍を有さないマウスの割合としてプロットした。

【図34】 colon26由来のhsp110又はgrp170による免疫化が、インターフェロン(IFN) γ 分泌を刺激することを示す棒グラフである。マウスをhsp110又はgrp170で免疫化して1週間後、ELISPOTアッセイ法のために脾細胞単離した。植物凝集素(PHA)処理したリンパ球を陽性対照として用いた。

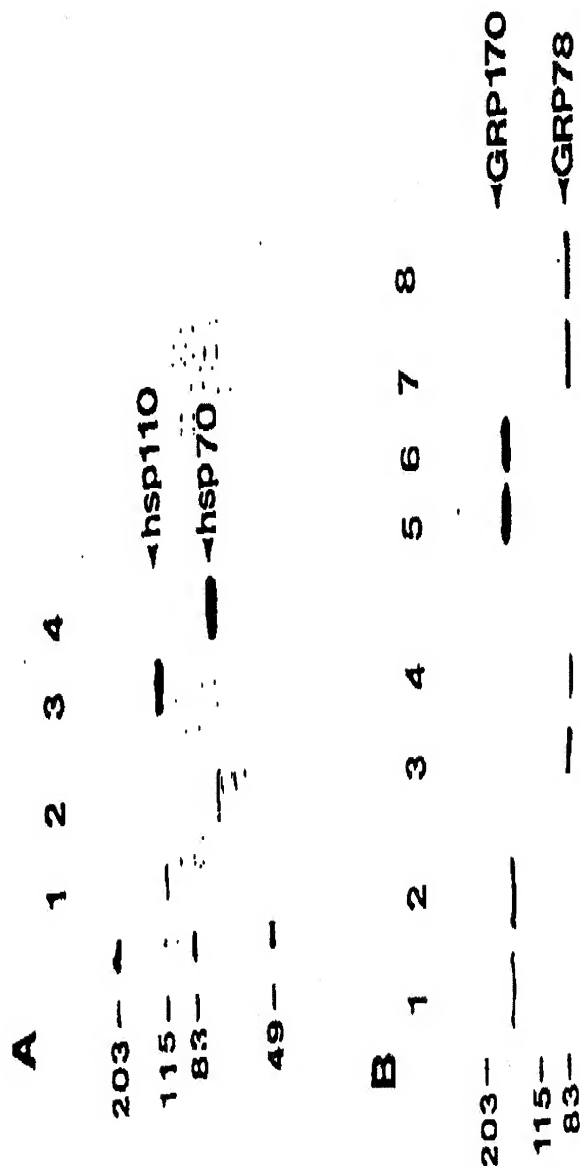
【図35】 B16F10腫瘍由来のgrp170による免疫化により誘起された腫瘍特異性CTL反応を示すグラフである。マウスは、grp170(40 μ g)で1週間間隔で2回免疫化した。2回目の免疫化の1週間後、脾細胞をエフエクター細胞として単離し、かつ放射線照射したB16F10細胞でインビトロにおいて5日間再刺激した。リンパ球を、⁵¹Cr標識B16F10又はMetAを標的細胞として用い、細胞傷害活性性について分析した。結果を、対照(丸)、肝由来のgrp170(四角)、B16F10由来のgrp170(上向き三角)、及びMeth A由来のgrp170(下向き三角)についてのエフエクター：標的の比の関数として、特異的溶解率(%)をプロットした。

【図36】 B16F10由来のgrp170による免疫化は、IFN γ の分泌を刺激することを示している。マウスをhsp110又はgrp170で免疫化した1週間後、脾細胞をELISPOTアッセイ法のために単離した。

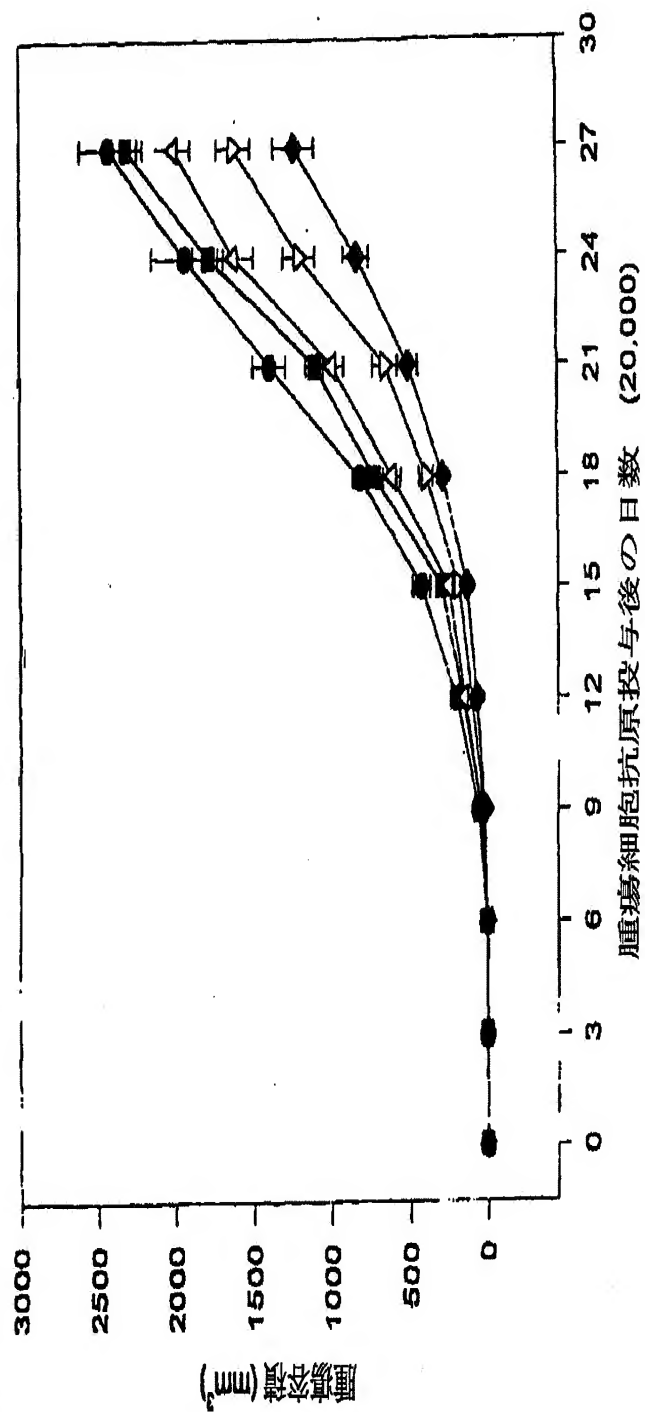
【図37】 C57BL/6マウスについての、 1×10^5 個のB16F10細胞を各マウスの

尾静脈へ静脈内接種した場合の肺転移を示している。腫瘍細胞注射後24時間で、マウスをPBS(黒丸)、肝由来のgrp170(白丸)、又は腫瘍由来のgrp170(40 μ g)で処置した。全部のプロトコールの間に、処置を3回行った。動物は腫瘍注射の3週間後に屠殺し、肺を摘出し、かつ表面コロニー数を数えた。

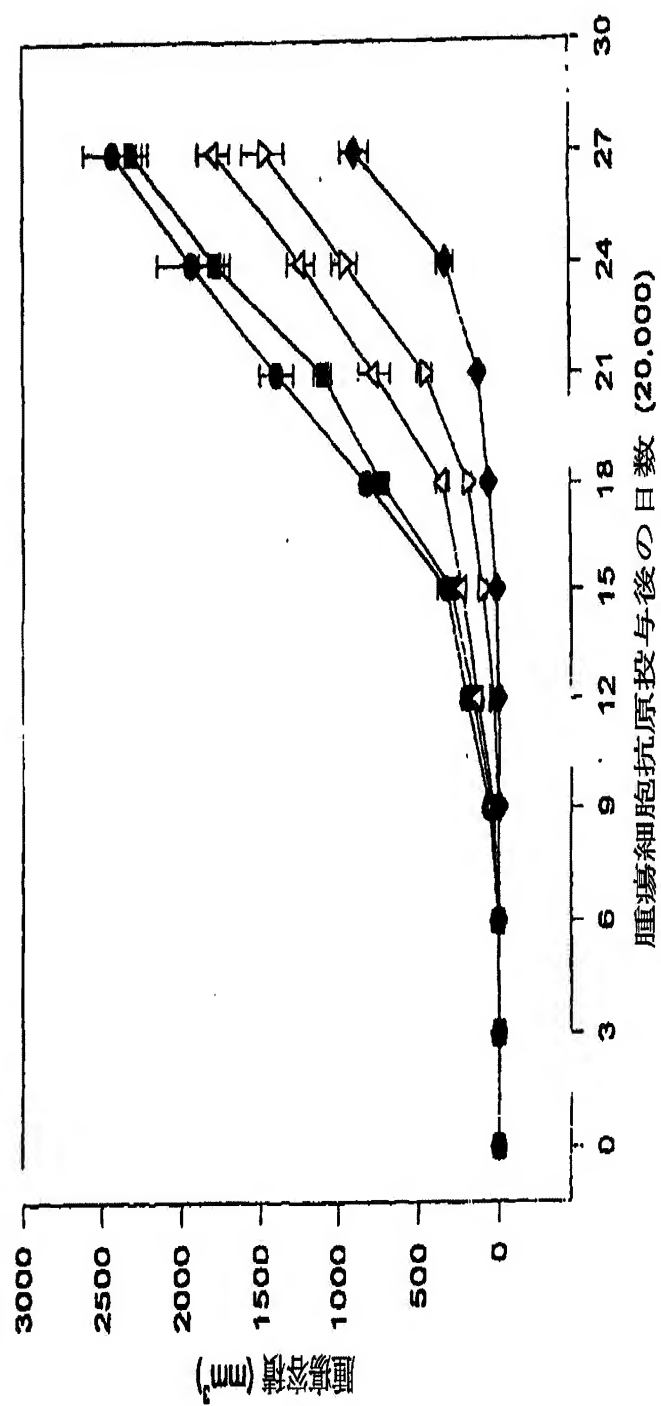
【 図 1 】



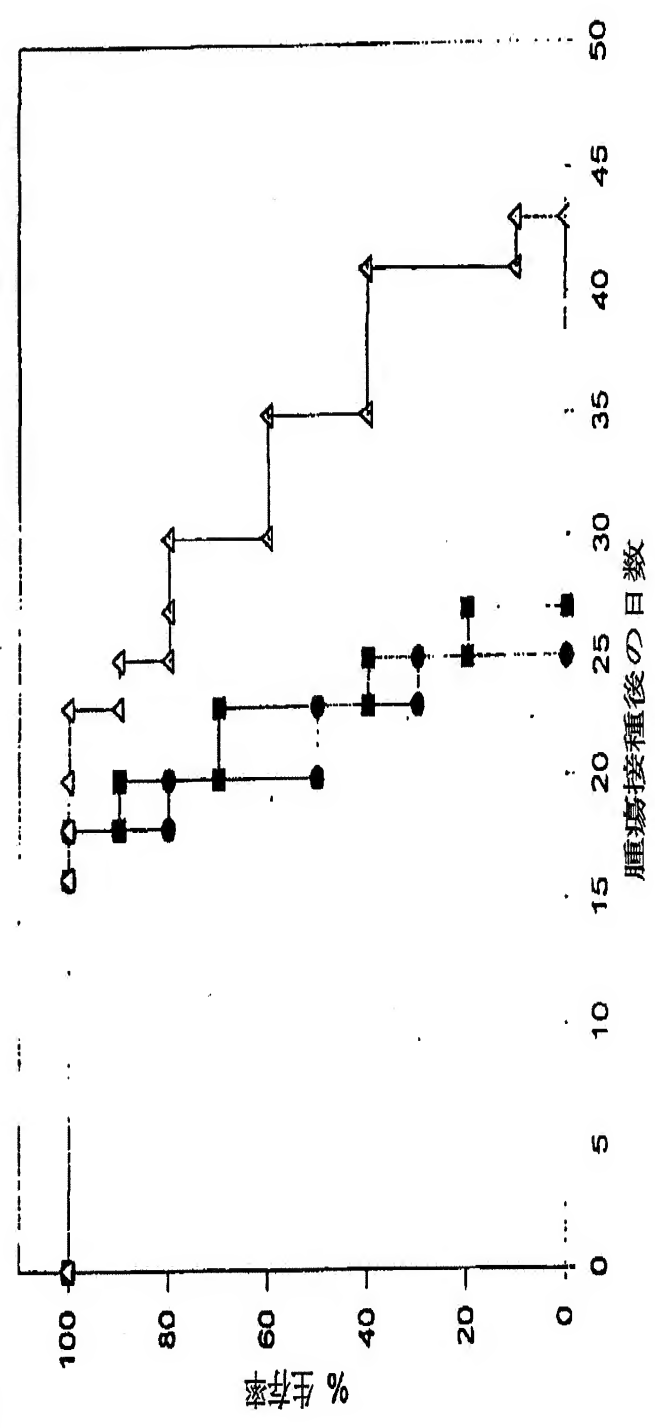
【 図 2 A 】



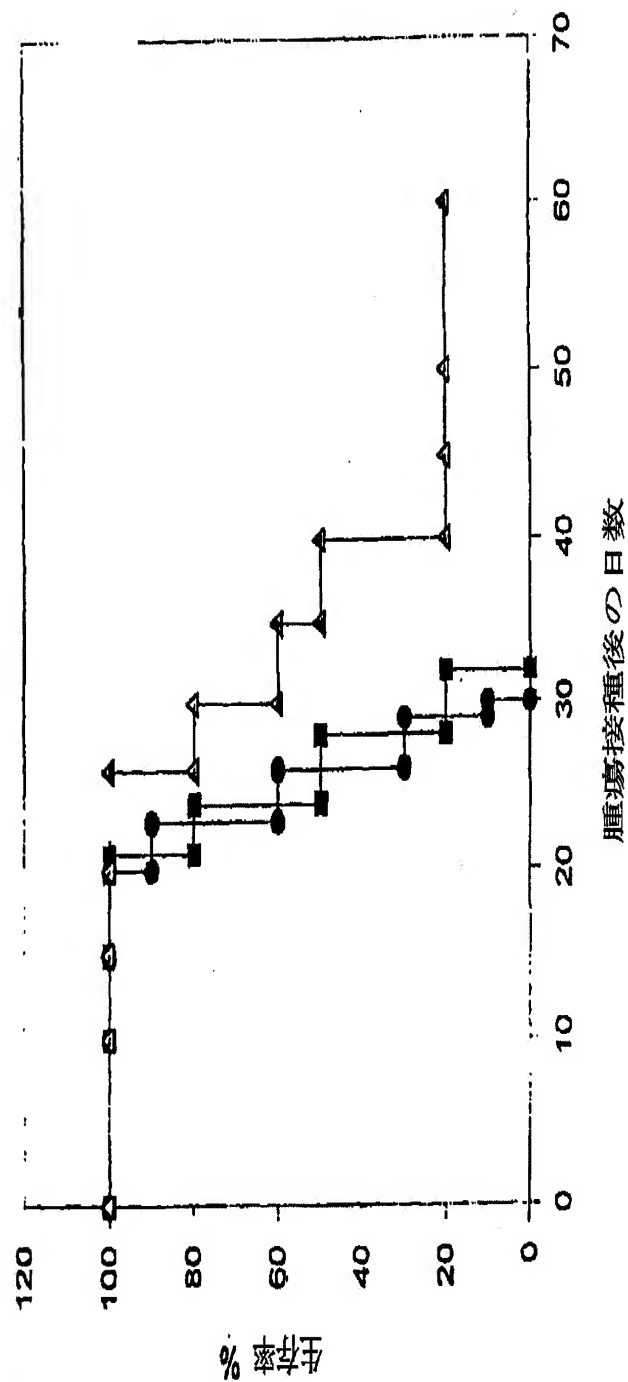
【 図 2 B 】

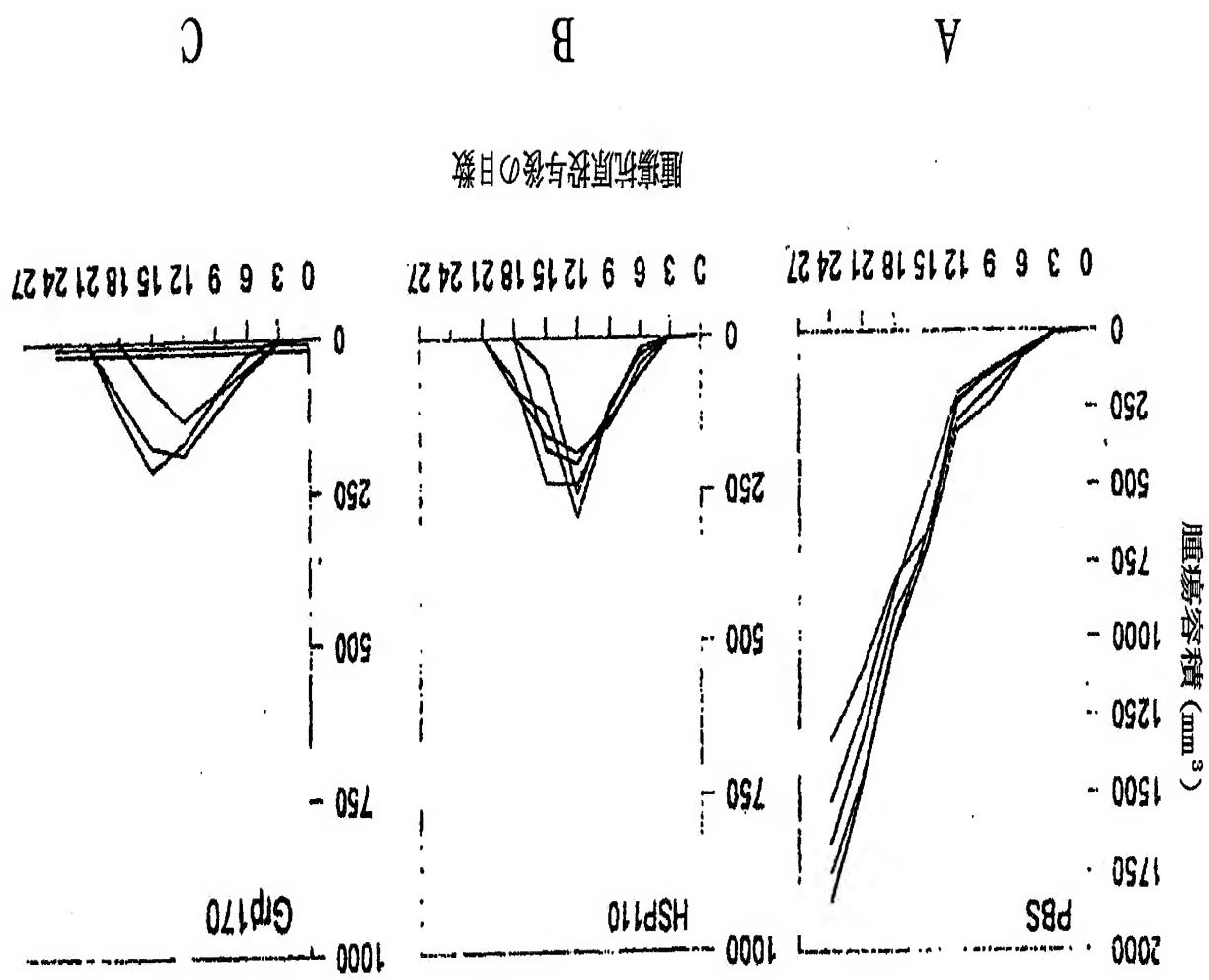


【 図 3 A 】



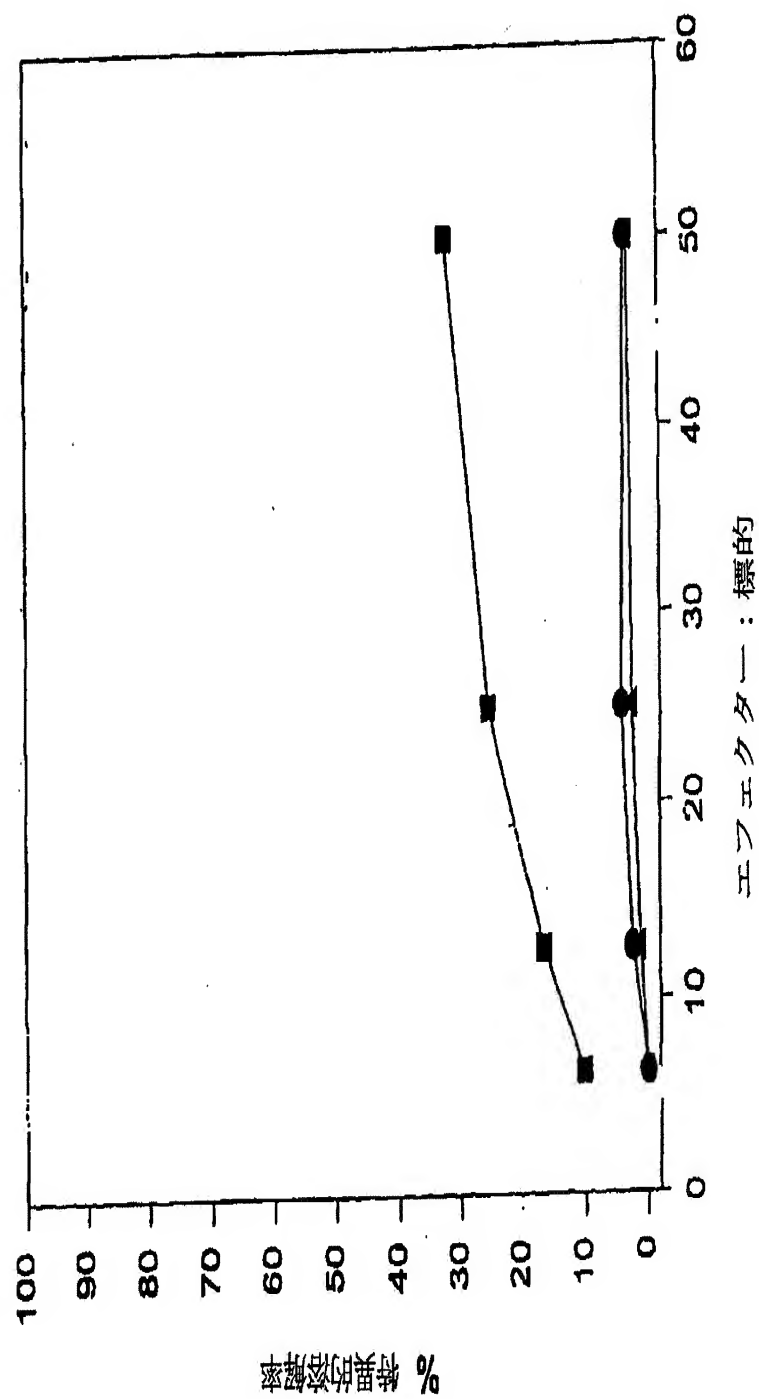
【 図 3 B 】



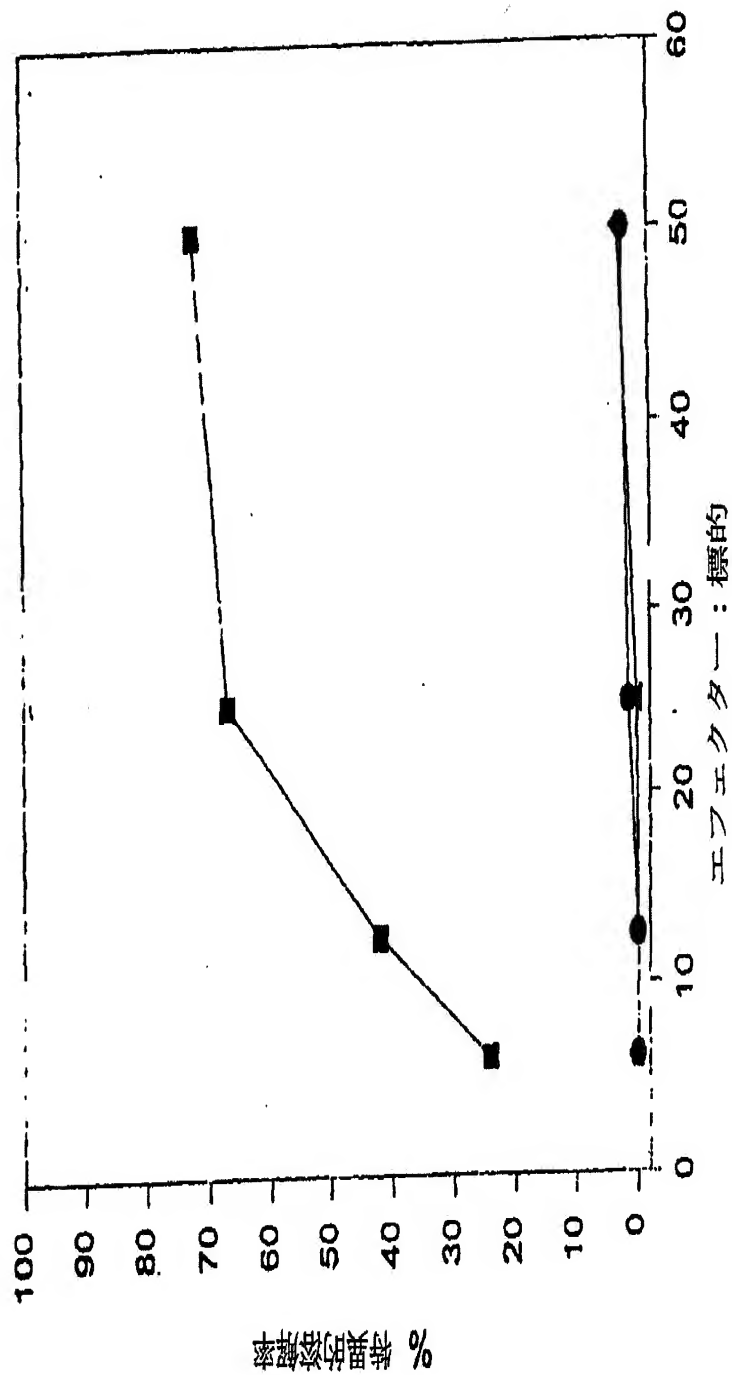


【 図 4 】

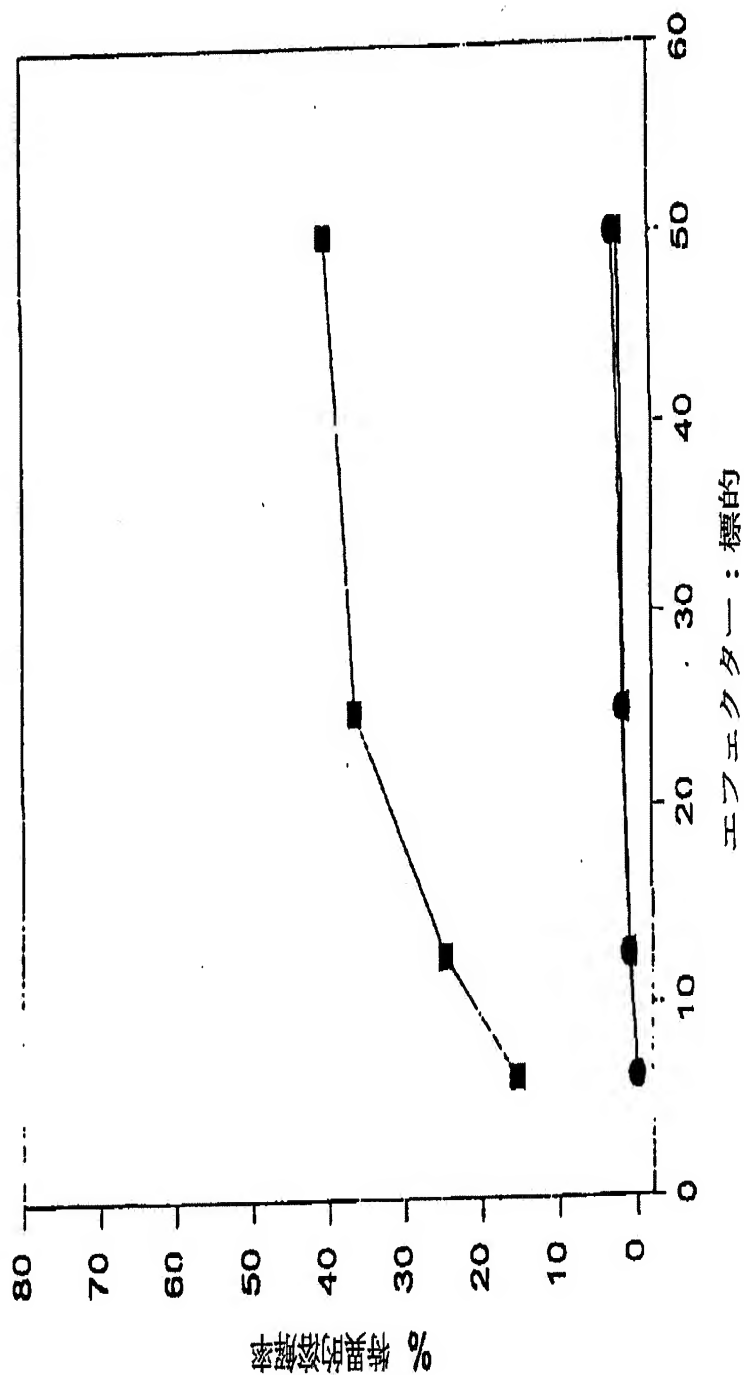
【 図 5 A 】



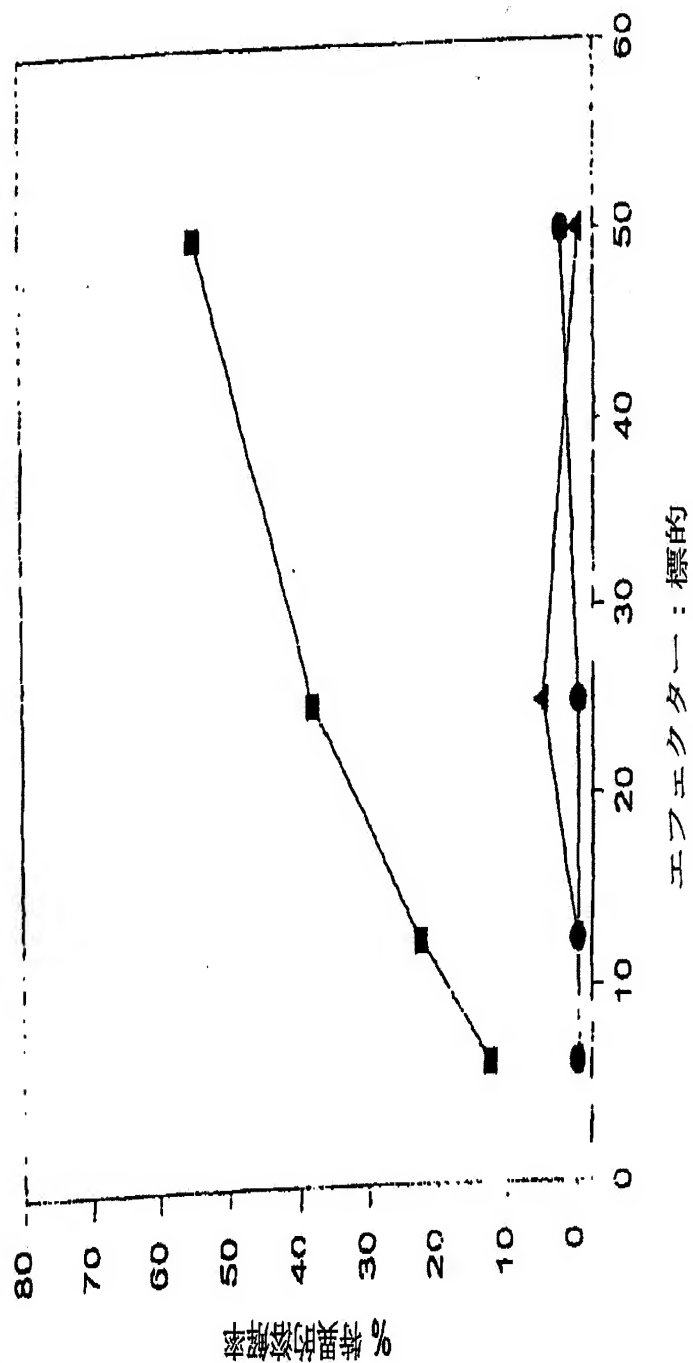
【 図 5 B 】



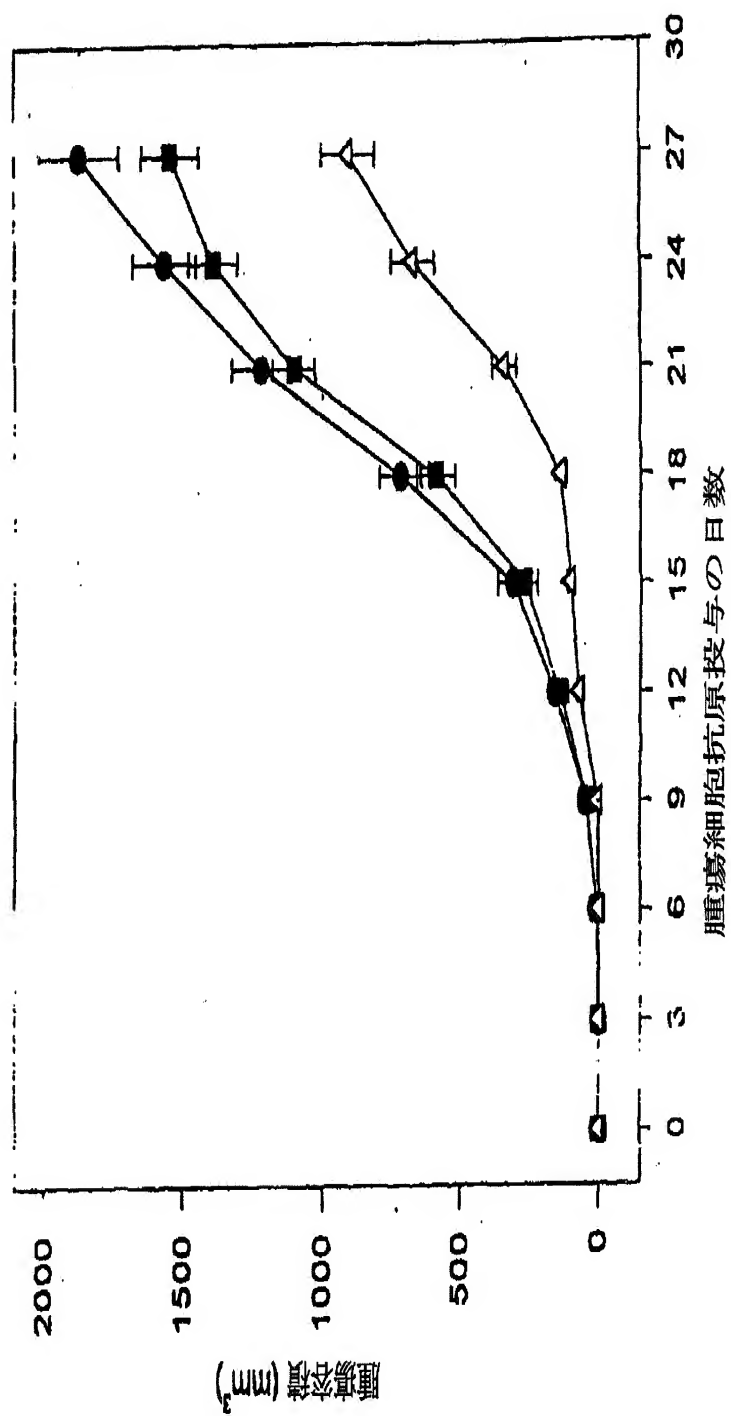
【 図 5 C 1 】



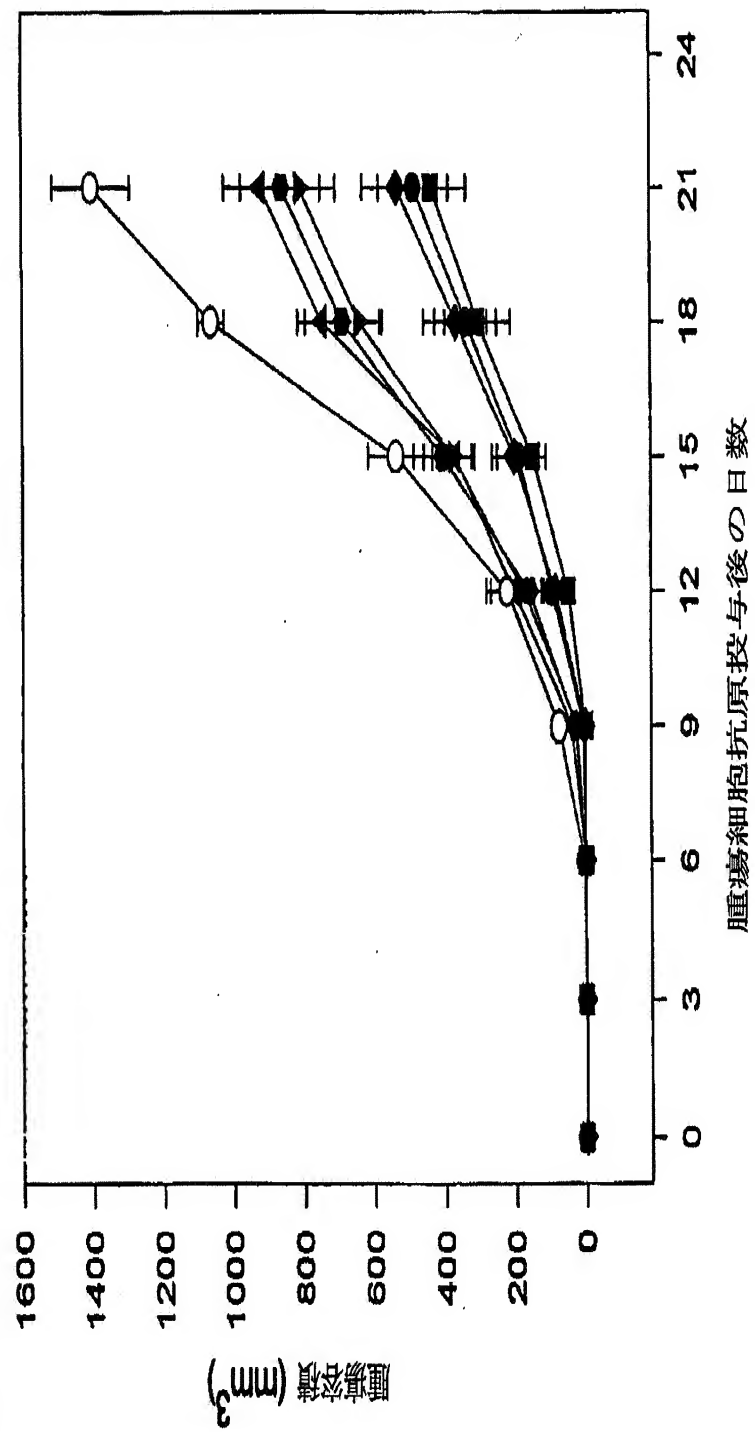
【 図 5 D 】



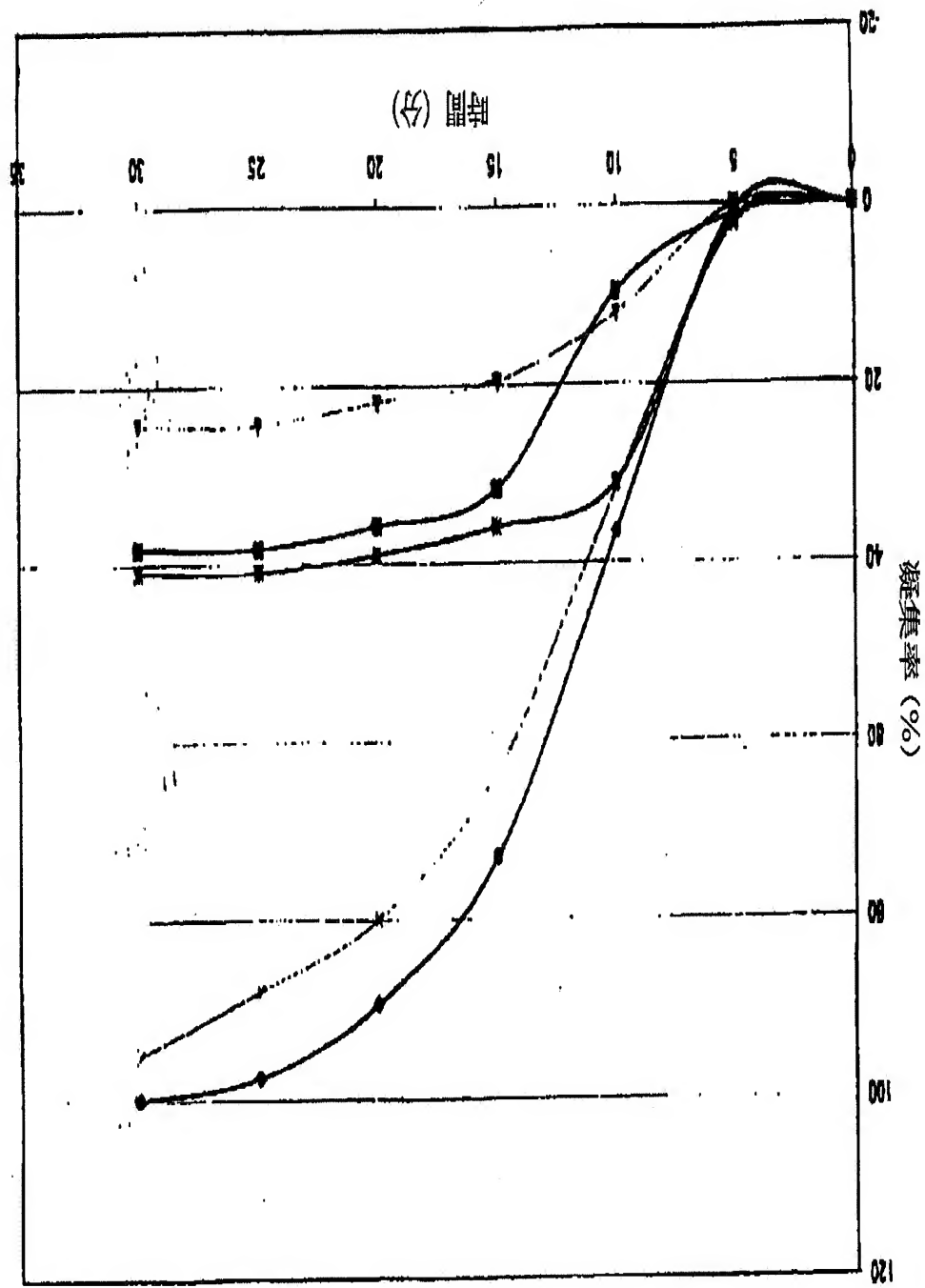
【 図 6 】



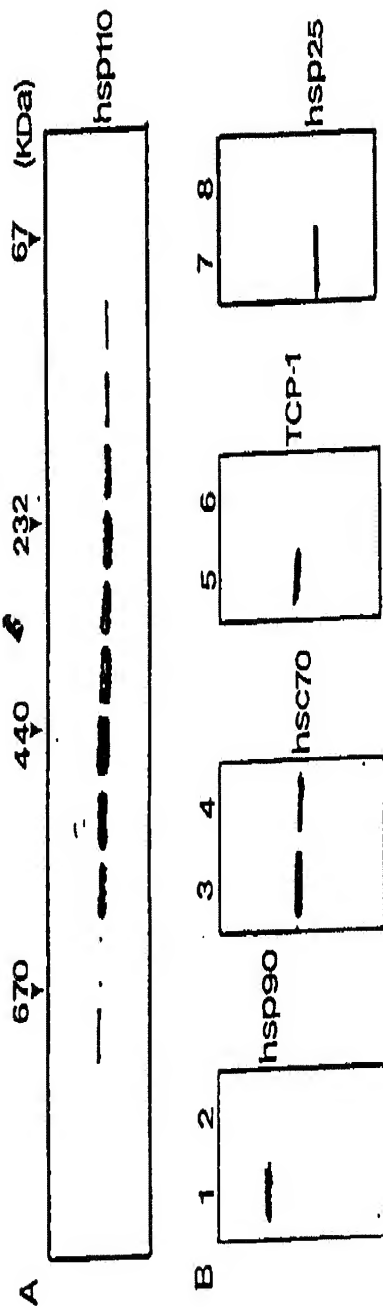
【 図 7 】



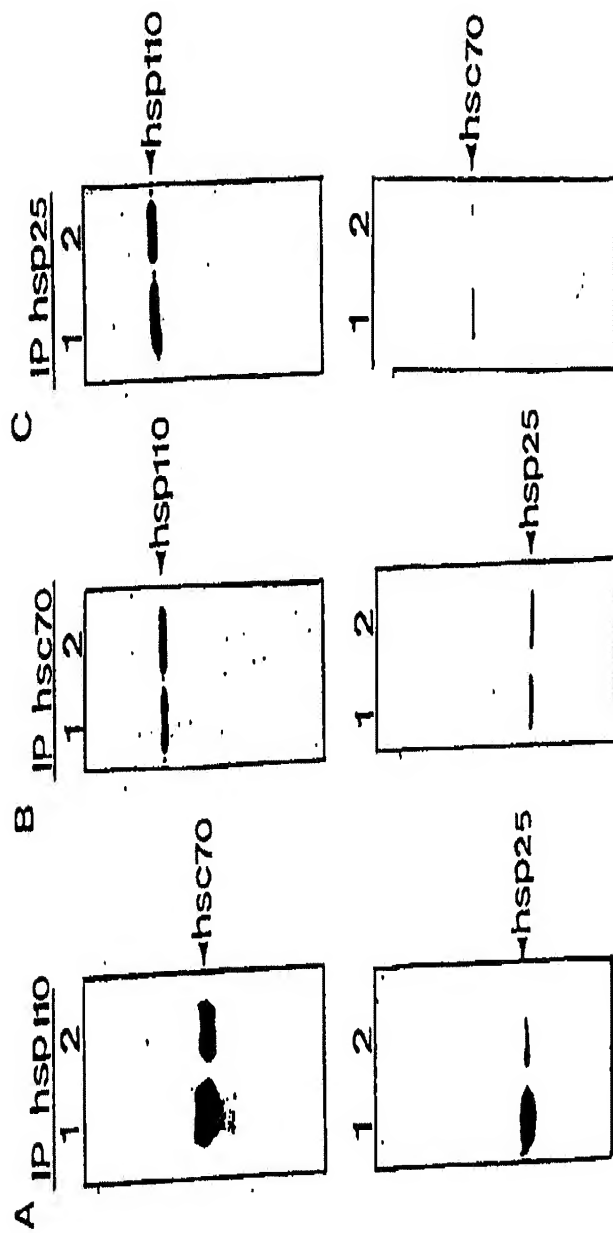
【 図 8 】



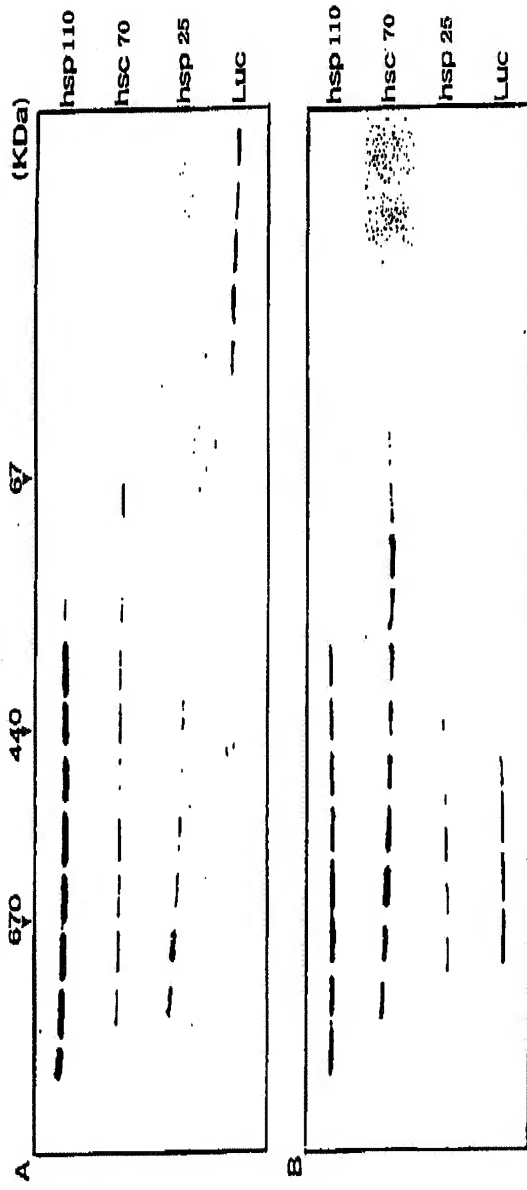
【 図 9 】



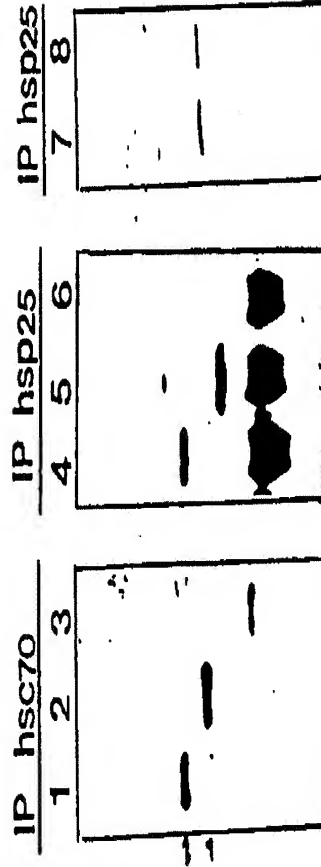
【 図 1 0 】



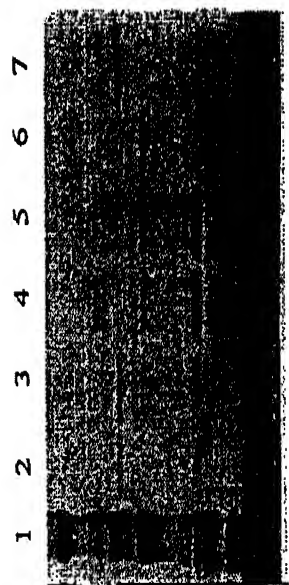
【 図 1 1 】



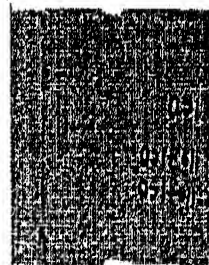
【 図 1 2 】



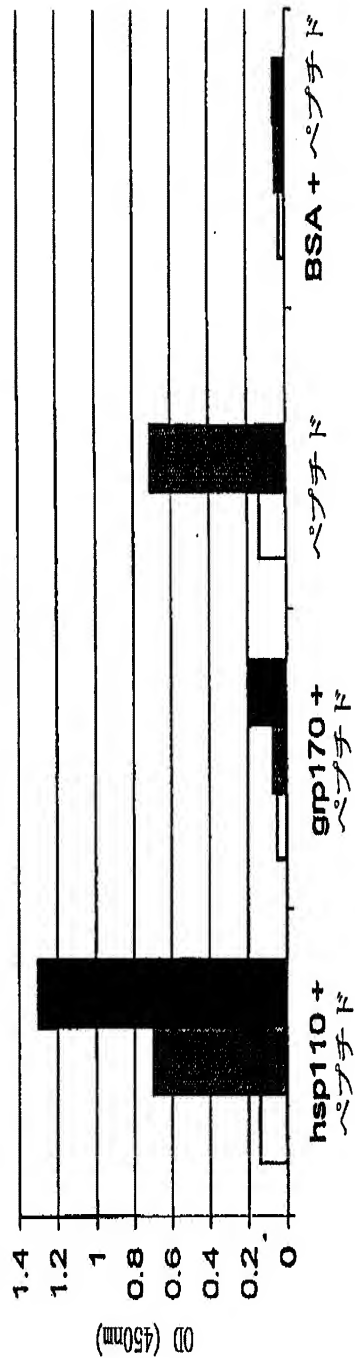
【 図 1 3 】



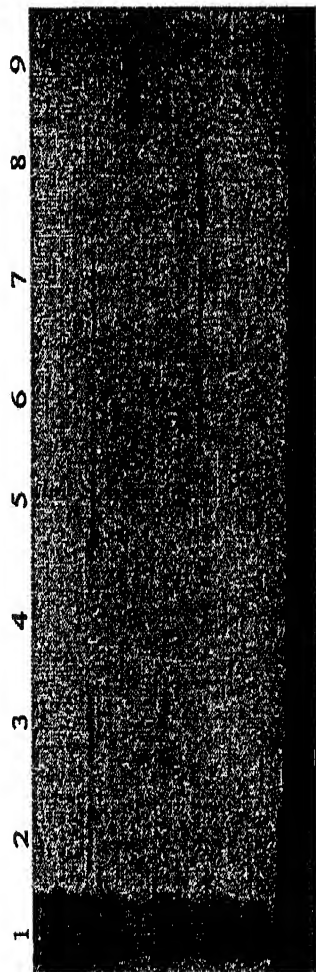
【 図 1 4 】



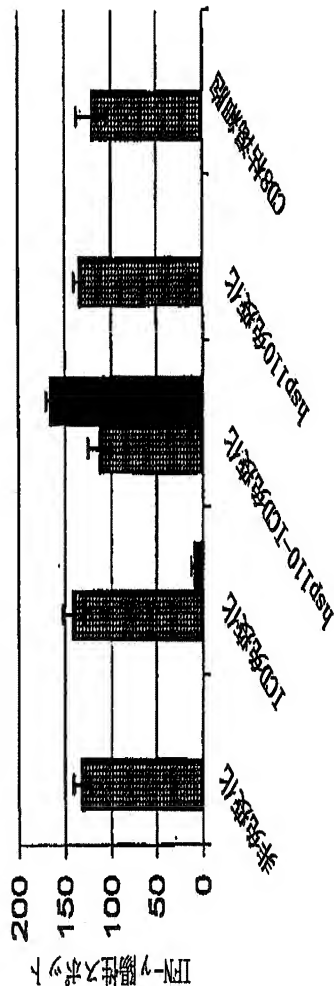
【 図 1 5 】



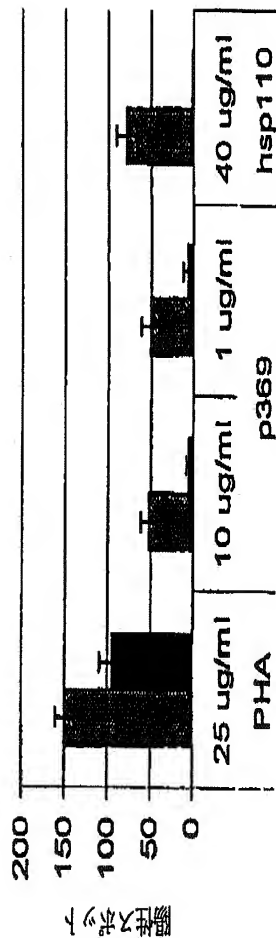
【 図 1 6 】



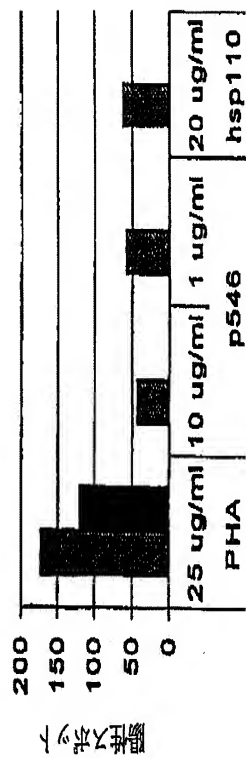
【 図 1 7 】



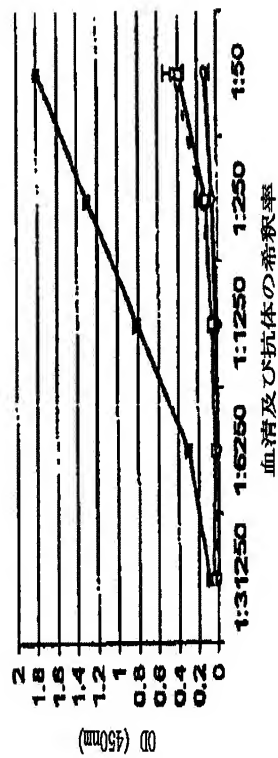
【 図 1 8 】



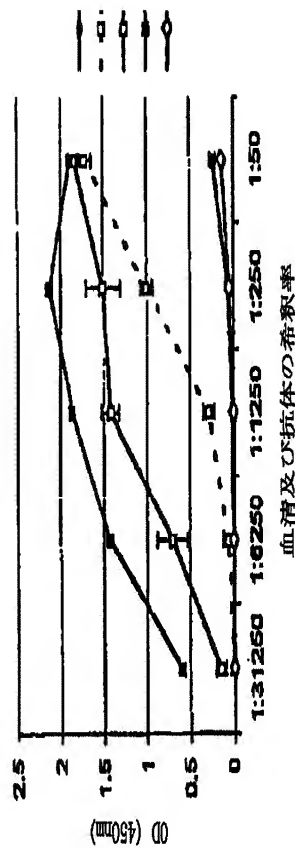
【 図 19 】



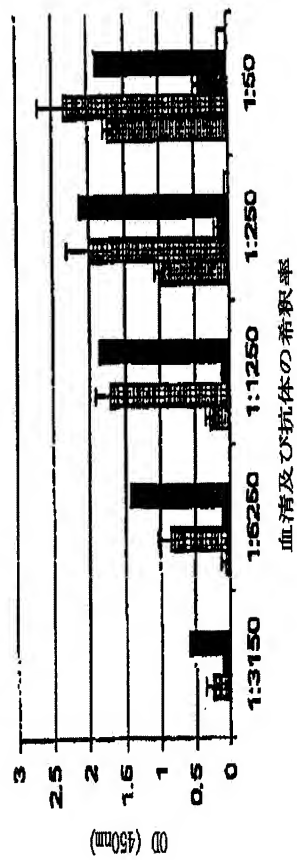
【 図 20 】



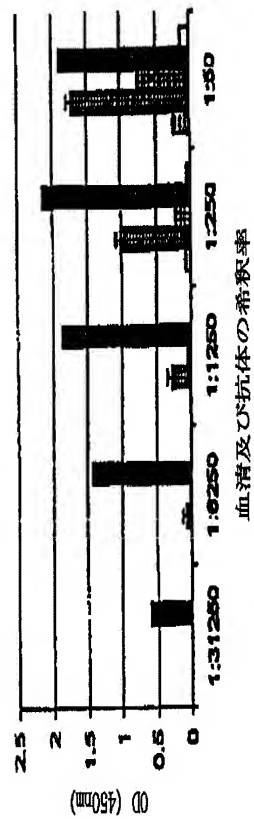
【 図 21 】



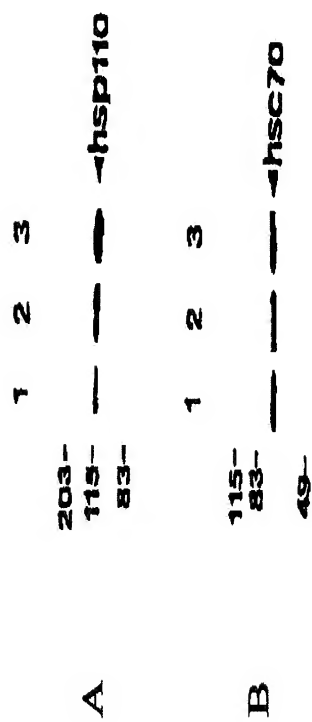
【 図 2 2 】



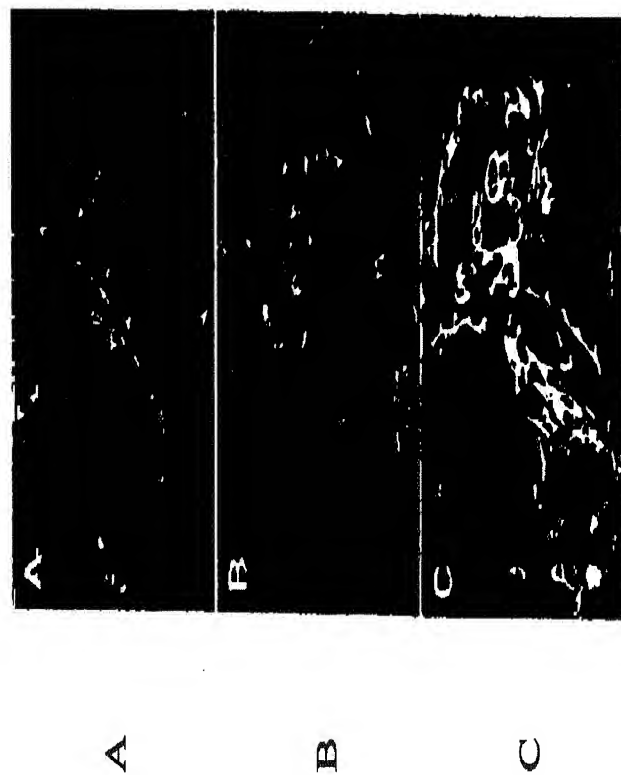
【 図 2 3 】



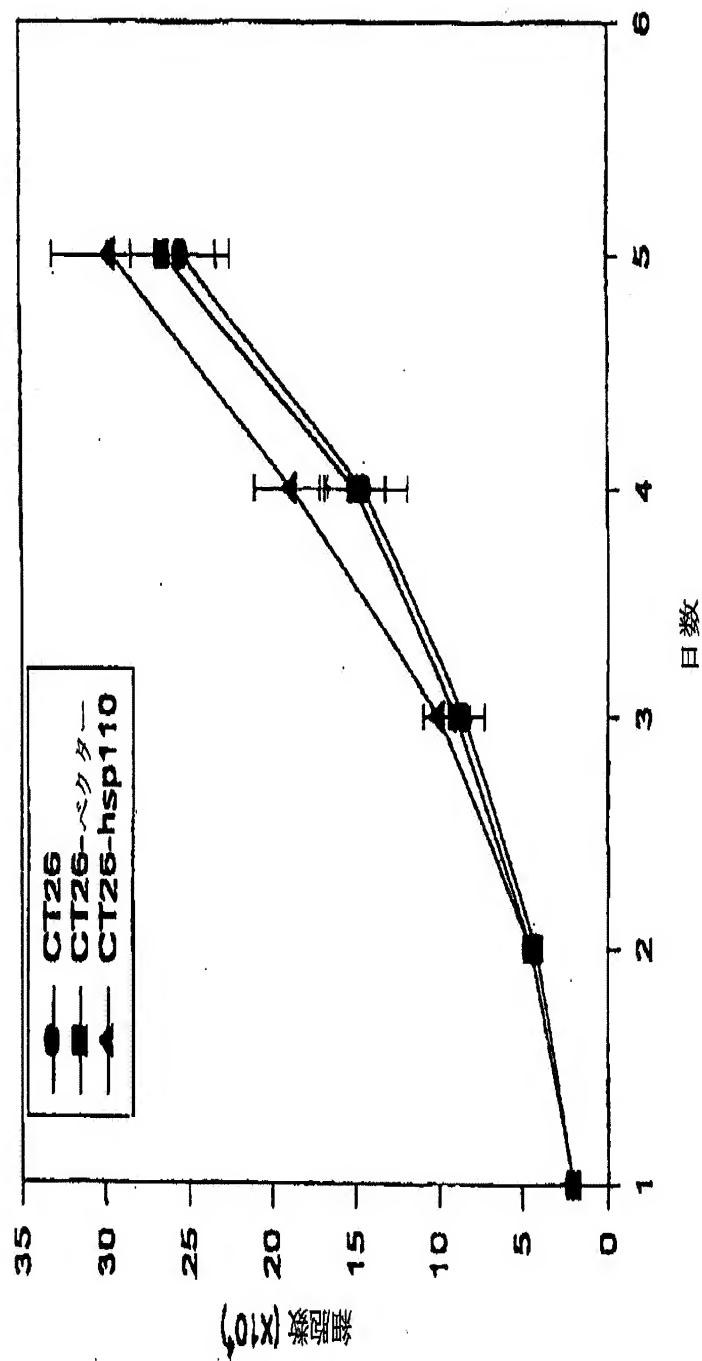
【 図 2 4 】



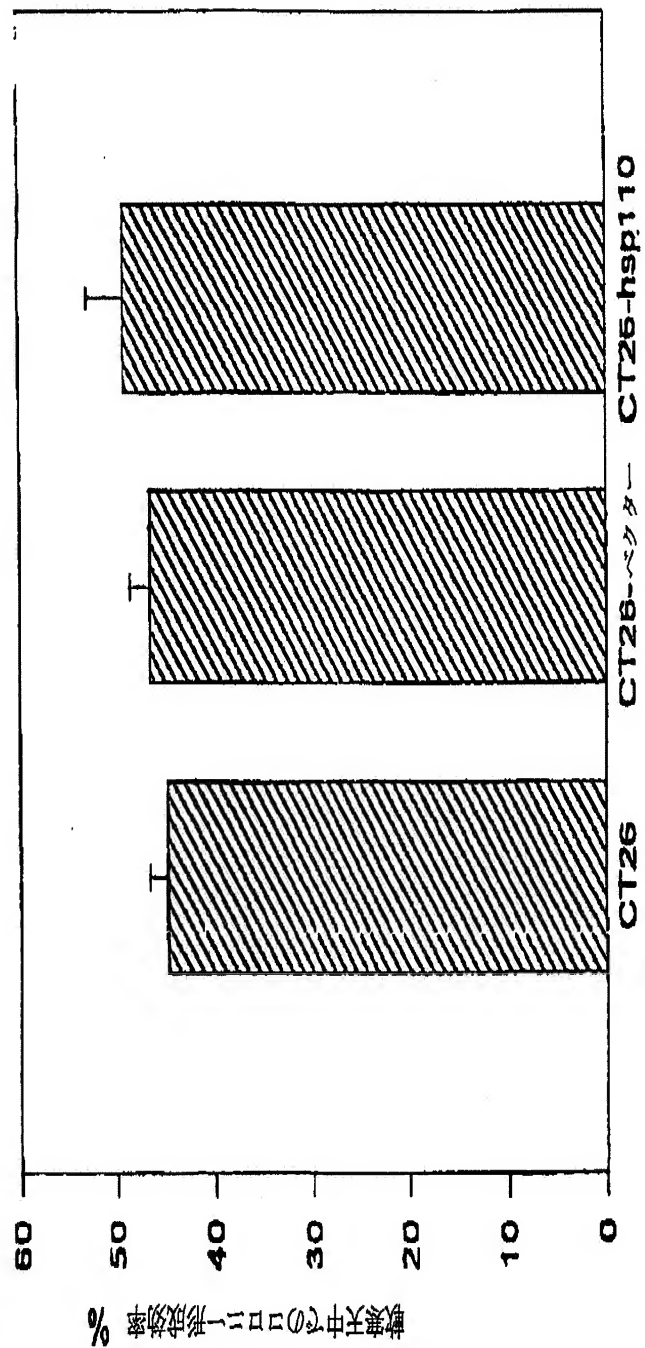
【 図 2 5 】



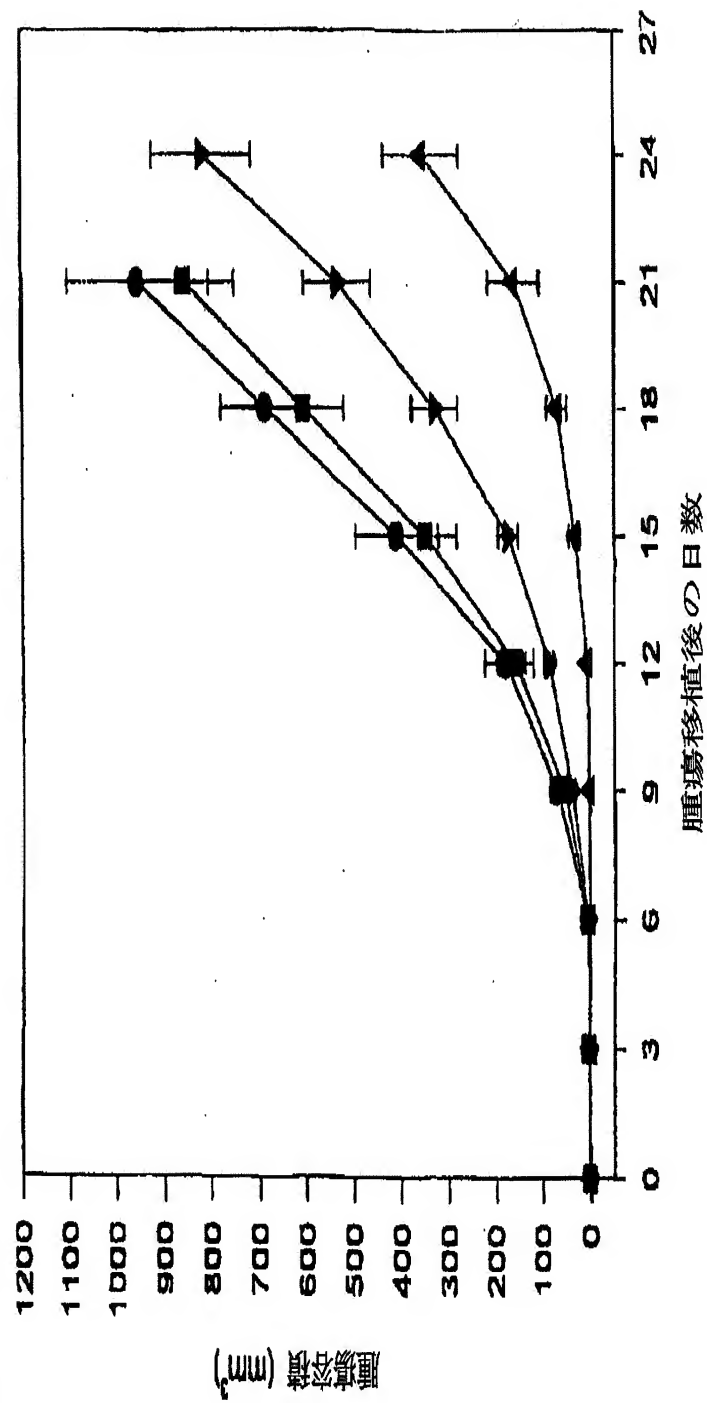
【 図 2 6 】



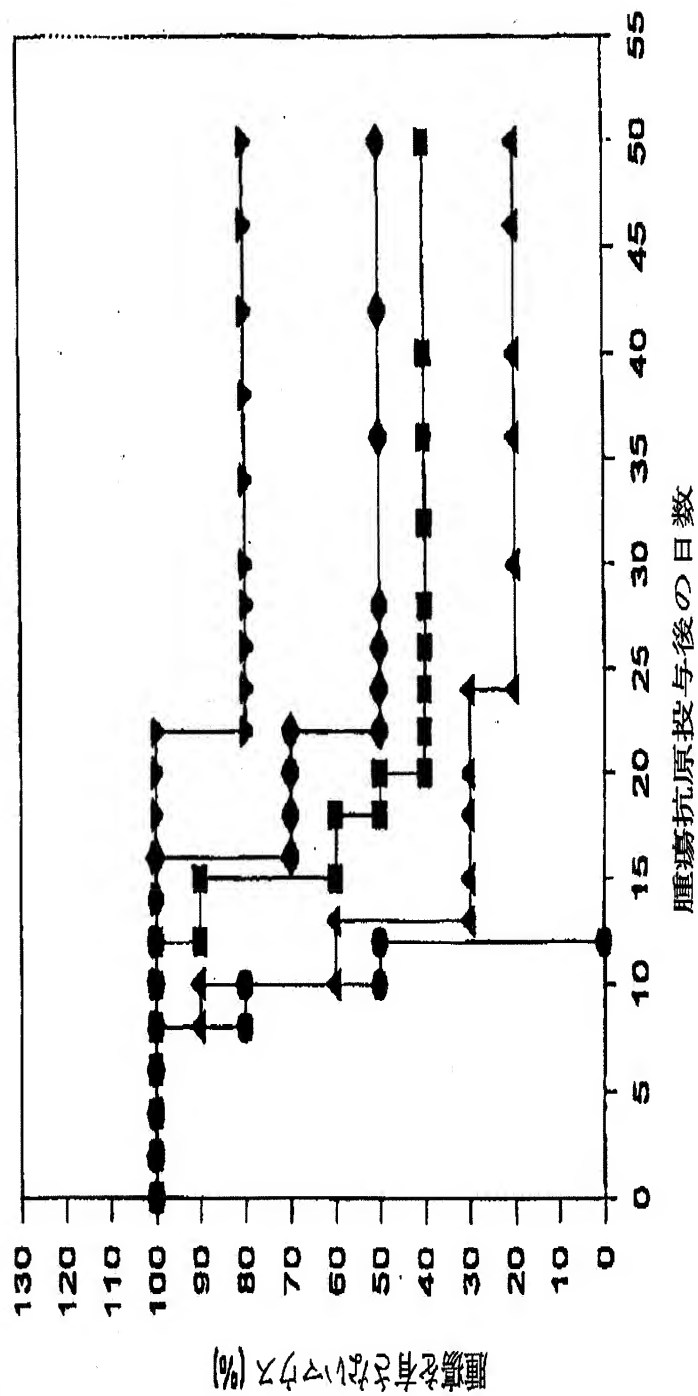
【 図 27 】



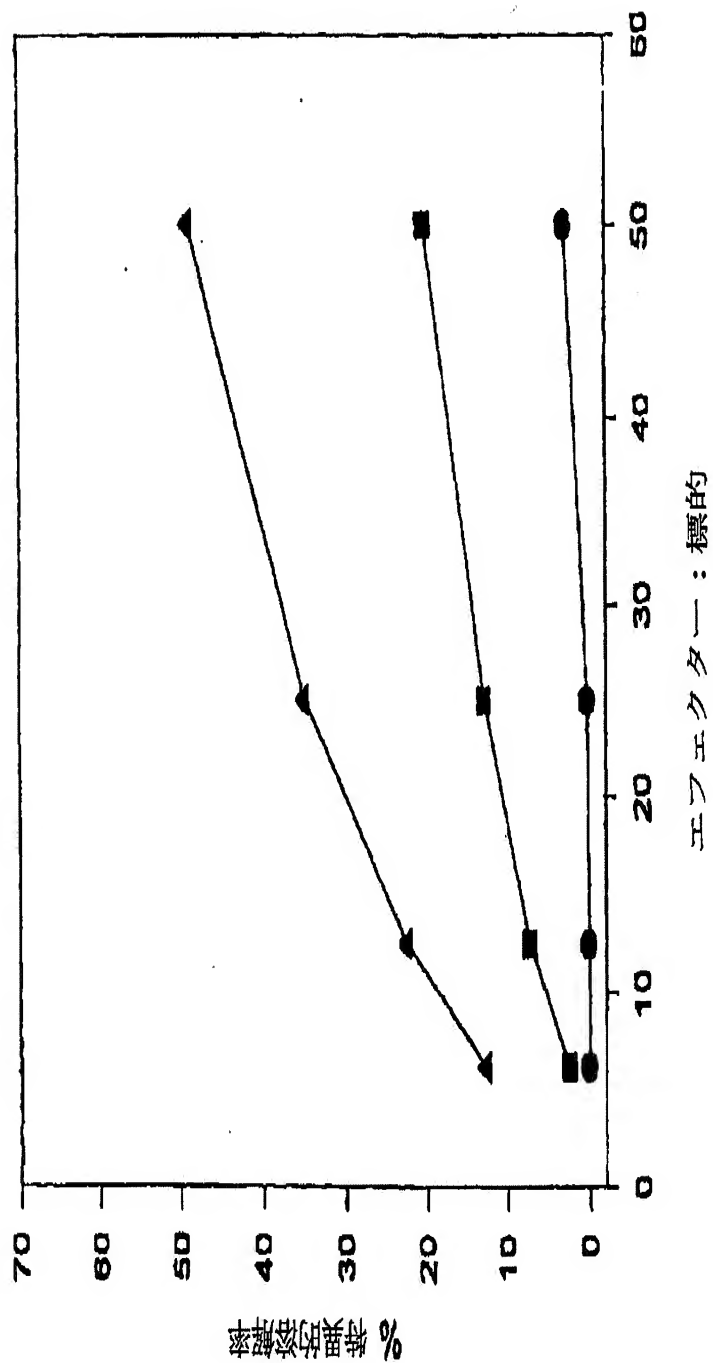
【 図 28 】



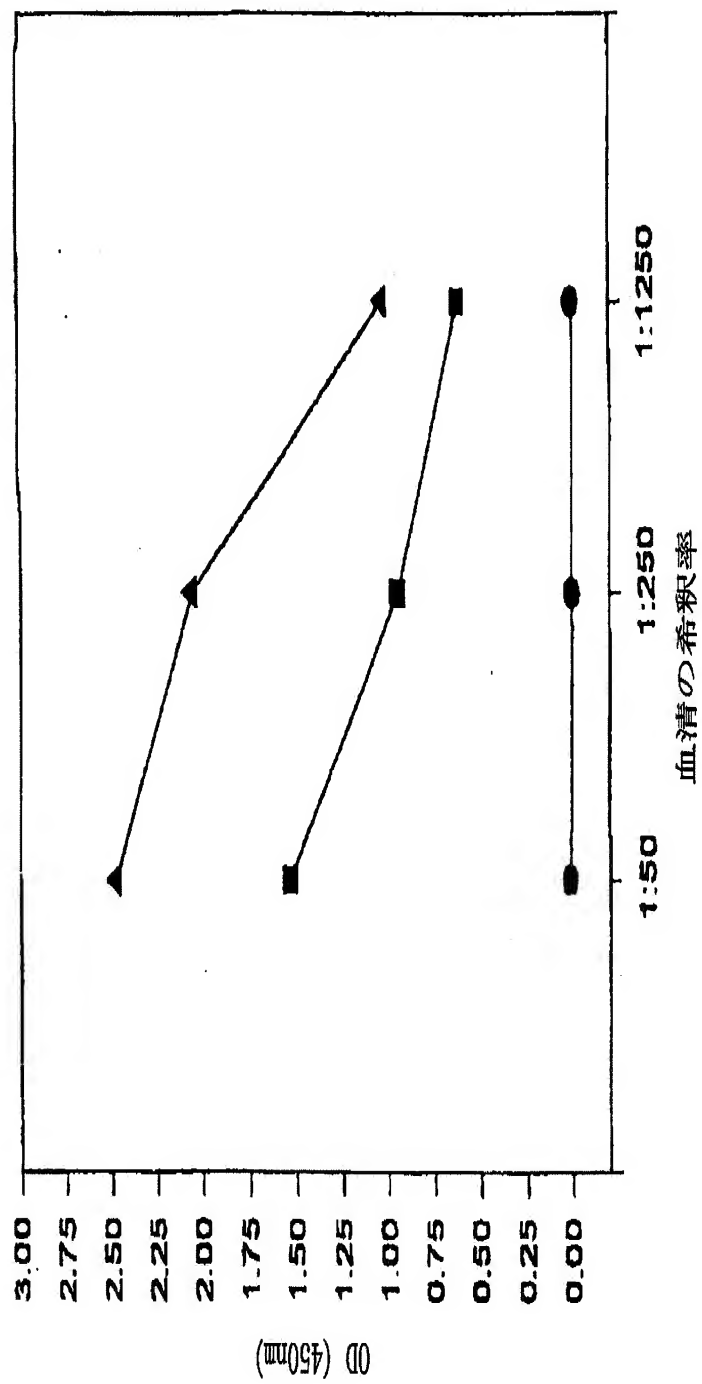
【 図 29 】



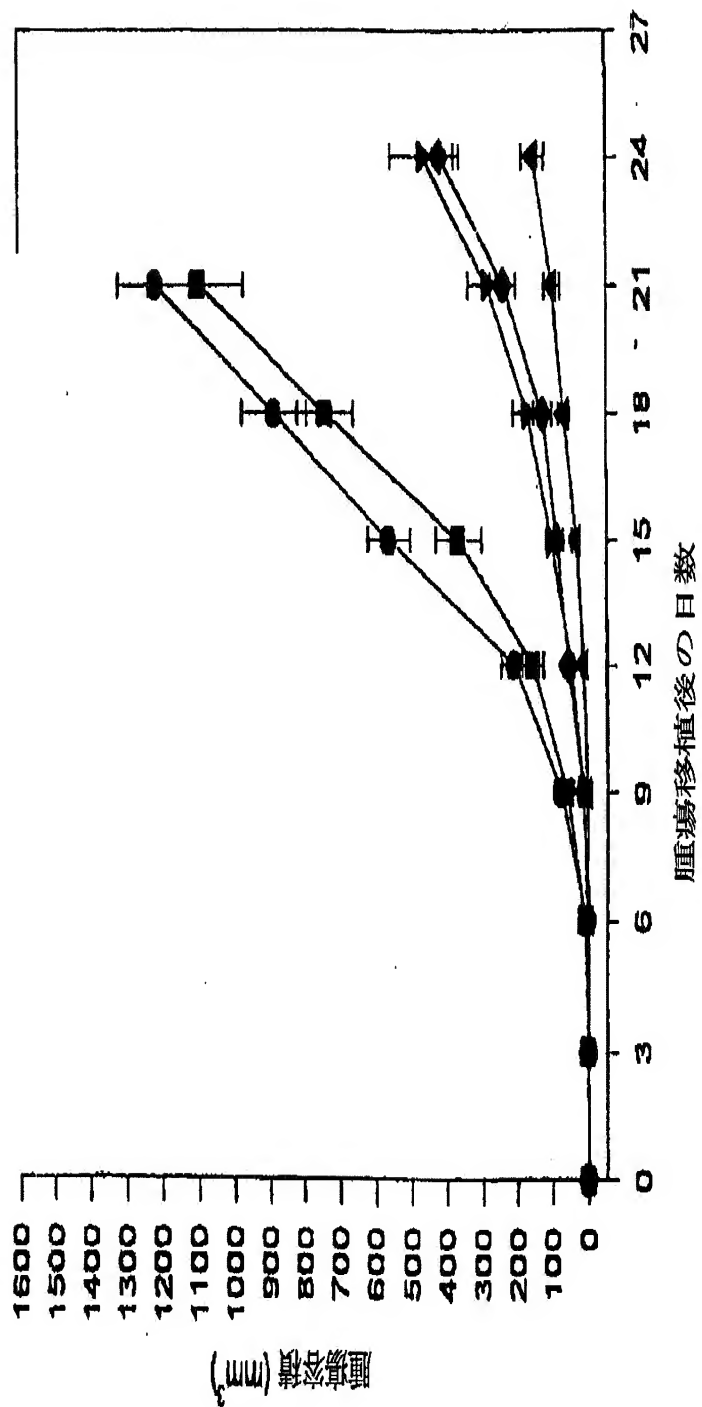
【 図 3 0 】



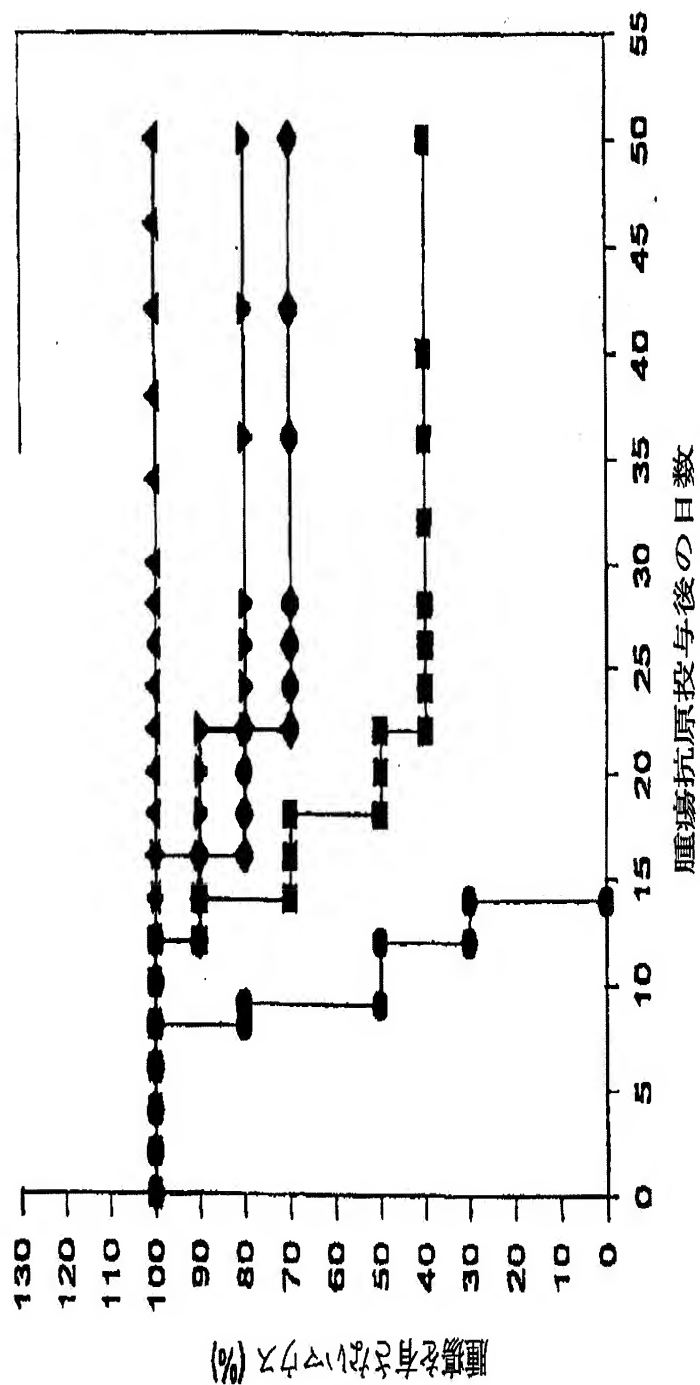
【 図 3 1 】



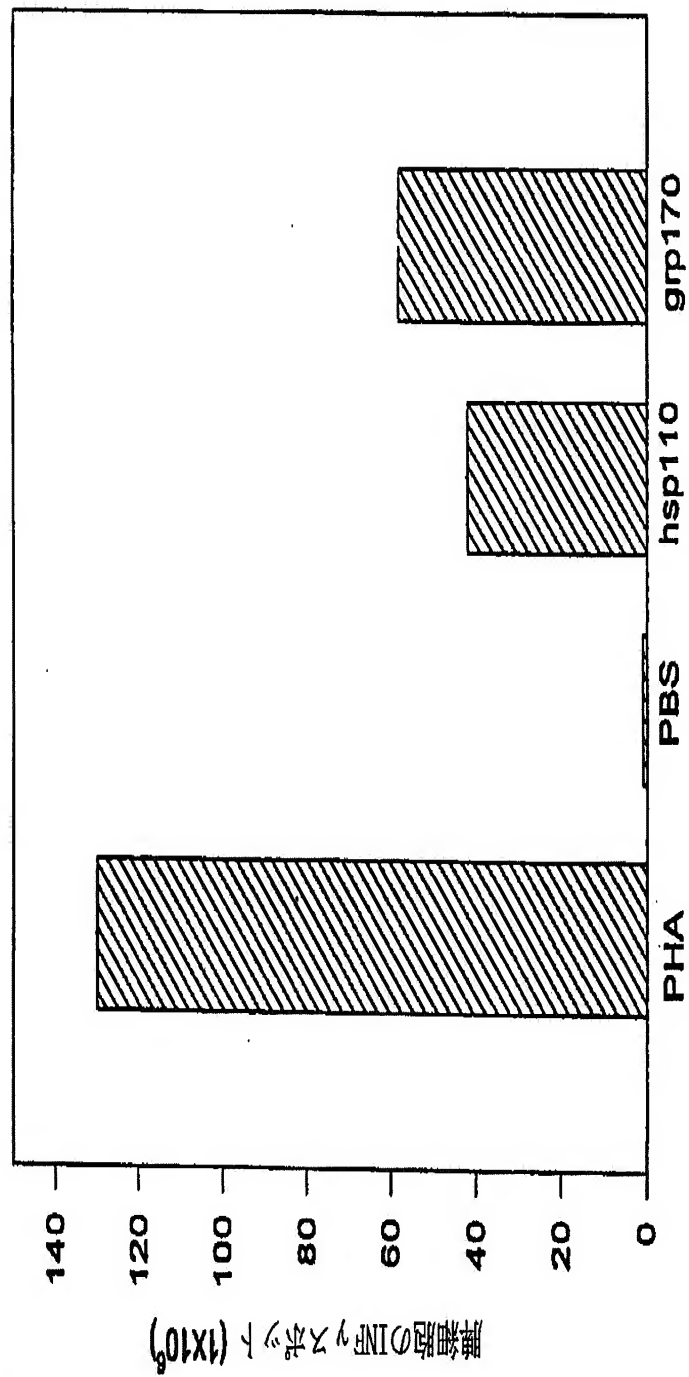
【 図 3 2 】



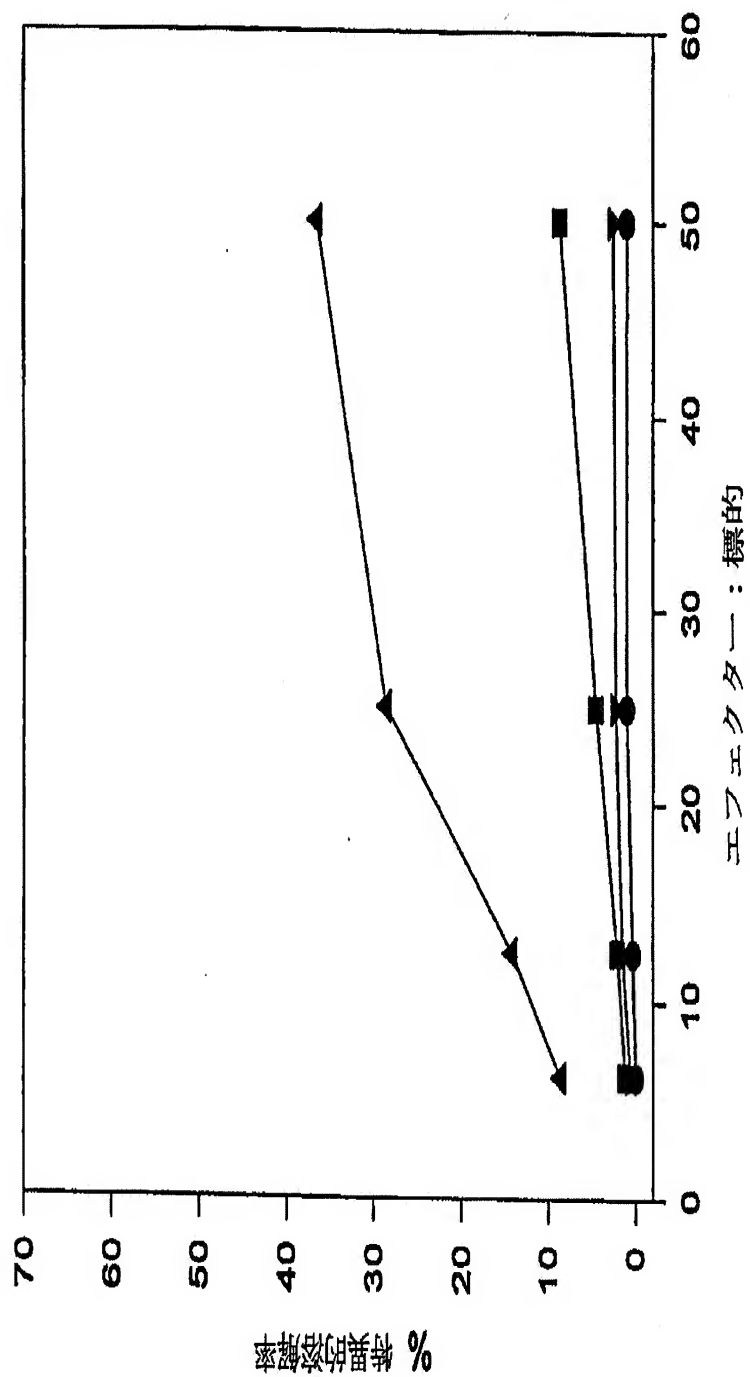
【 図 3 3 】



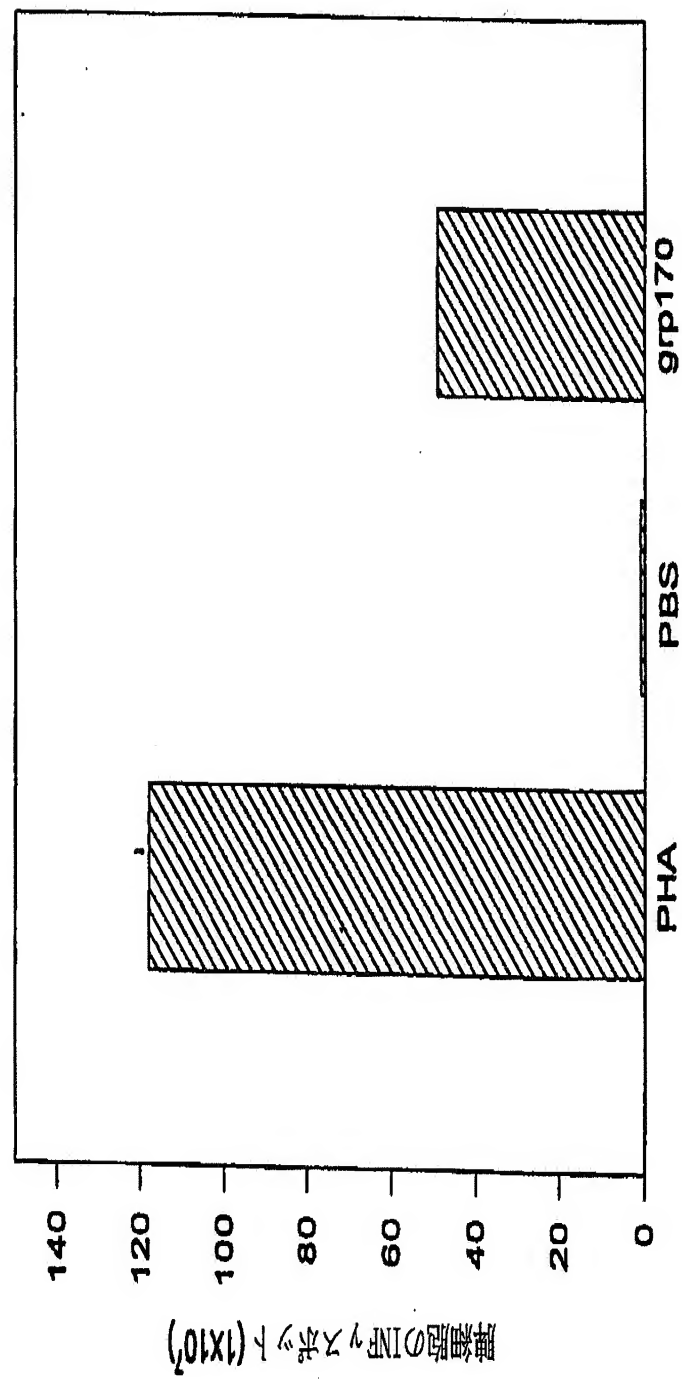
【 図 3 4 】



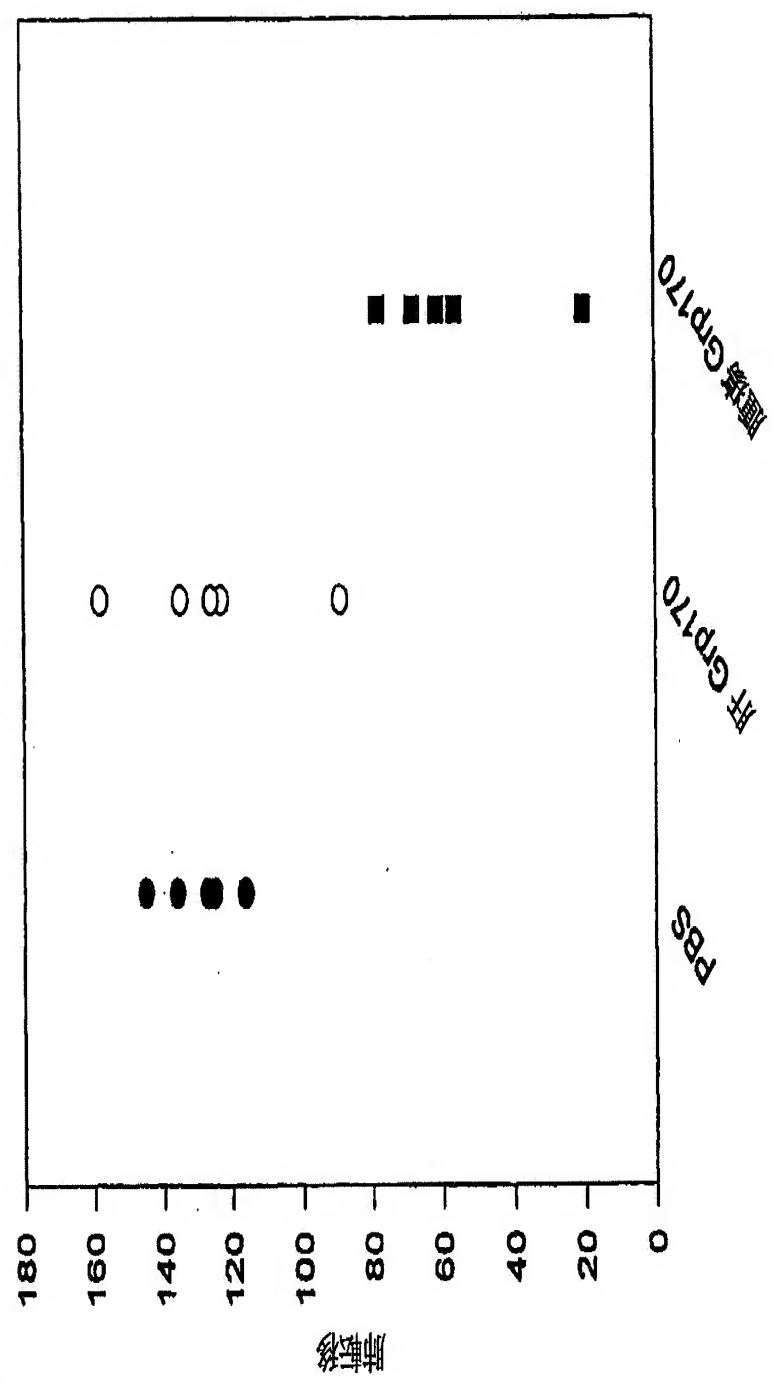
【 図 3 5 】



【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/385 C07K14/47 A61P31/06 A61P35/00		Patent Application No PCT/US 00/27023
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 10001 A (FORHAM UNIVERSITY) 20 March 1997 (1997-03-20) page 55, line 5 - page 58, line 11 claims 1-61	1-8, 16-24
X	WO 97 10002 A (FORDHAM UNIVERSITY) 20 March 1997 (1997-03-20) page 7, line 23 - line 35 page 29, line 29 - page 30, line 18 claims 1-43	1-8, 11-14, 16-36
X	WO 96 10411 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 11 April 1996 (1996-04-11) page 9, line 17 - line 26 page 15, line 25 - line 29 claims 1-18	1-8, 16-24
-/-		
[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [K] Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or other aspects of the document, but does not constitute a prior art document or other special reason (see special category) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 March 2001		Date of mailing of the international search report 12/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5016 Patentstein 2 NL 2260 HV Rijswijk NL 4300 CA Dordrecht FR: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Statou, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Inter. Appl. Application No.
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	PCT/US 00/27023
X	WO 98 34641 A (FORHAM UNIVERSITY) 13 August 1998 (1998-08-13) the whole document	1-8, 11-24, 33-36
X	WO 99 07860 A (STRESSEN BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 18 February 1999 (1999-02-18) the whole document	1-10, 16-19, 22-24, 34-36, 41-46
X	WO 95 24923 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 21 September 1995 (1995-09-21) claims 1-36	1-8, 16-24, 33-36, 41-46
A	D R PALLEROS ET AL: "Hsp70-protein complexes" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, 269, no. 18, 6 May 1994 (1994-05-06), pages 13107-13114, XP002130137 ISSN: 0021-9258 abstract	1-46
A	DILLON D C ET AL: "Molecular characterization and human T-cell responses to a member of a novel Mycobacterium tuberculosis mtb39 gene family" INFECTION AND IMMUNITY, US, AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, 06, pages 2941-2950, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 2941-2950, XP002143391 ISSN: 0019-9567 cited in the application abstract	1-46
A	CHEN X ET AL: "THE 170 KDA GLUCOSE REGULATED STRESS PROTEIN IS A LARGE HSP70- HSP110-LIKE PROTEIN OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM" FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 380, no. 1/02, 12 February 1996 (1996-02-12), pages 68-72, XP002060249 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-46

Form PCT/IB/210 (Continuation of Search Report) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Inter. and Application No. PCT/US 00/27023	Publication date
WO 9710001	A	20-03-1997	US	5837251 A 703101 B 7018196 A 0859631 A 11514985 T 6139841 A 6162436 A 6143299 A 6136315 A 9607757 A		17-11-1998 18-03-1999 01-04-1997 26-08-1998 21-12-1999 31-10-2000 19-12-2000 07-11-2000 24-10-2000 07-04-1997
WO 9710002	A	20-03-1997	US	5985270 A 728929 B 6973596 A 0857068 A 11512433 T 6156502 A 9607756 A		16-11-1999 18-01-2001 01-04-1997 12-08-1998 26-10-1999 05-12-2000 16-04-1997
WO 9610411	A	11-04-1996	US	5750119 A 709643 B 2281995 A 2201498 A 1167440 A 0784477 A 10506628 T 6017544 A		12-05-1998 02-09-1999 26-04-1996 11-04-1996 10-12-1997 23-07-1997 30-06-1998 25-01-2000
WO 9834641	A	13-08-1998	US	6017540 A 724772 B 6145598 A 0973548 A 9800978 A		25-01-2000 28-09-2000 26-08-1998 26-01-2000 17-08-1998
WO 9907860	A	18-02-1999	AU	6492498 A 9812272 A 1270635 T 1002110 A 338478 A		01-03-1999 18-07-2000 18-10-2000 24-05-2000 06-11-2000
WO 9524923	A	21-09-1995	US	5961979 A 701732 B 2100995 A 2185651 A 0750513 A 10501520 T 6048530 A		05-10-1999 04-02-1999 03-10-1995 21-09-1995 02-01-1997 10-02-1998 11-04-2000

フロントページの続き

ターマコード (参考)

識別記号	F I	
(51) Int. Cl. ⁷		
A 61 P 35/00	C O 7 K	14/195
C 12 N 5/06		14/47
5/10		14/82
// C O 7 K 14/195		19/00
14/47	A 61 K	37/02
14/82	C 12 N	5/00
19/00		
C 12 N 15/09		15/00

Z N A
E
B
A

(31)優先権主張番号	60/215, 497
(32)優先日	平成12年6月30日 (2000. 6. 30)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(81)指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW
(72)発明者	サブジェック ジョン アール. アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ウィリアムズビル フランクハウザー ロード 66
(72)発明者	ヘンダーソン ロバート エイ. アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル ウェスト ガバメント ウェイ 3316
(72)発明者	リバスキー エリザベス エイ. アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ウィリアムズビル フランクハウザー ロード 66
(72)発明者	カジム ラティフ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 アマースト ストーンクロフト レーン 41

150

F 夕一△ (參考)

4B024	AA01	BA31	BA36	CA01	CA07
	DA02	DA03	GA11		
4B065	AA36Y	AA93Y	AB01	AC14	
	BA01	BA30	BD50	CA24	CA45
4C084	AA02	AA03	AA13	BA22	BA41
	BA44	NA14	ZB261	ZB352	
4C085	BA09	BB01	CC03	EE06	
4H045	AA11	AA30	BA41	CA11	CA40
	DA86	EA22	EA31	FA72	FA74

【要約の続き】

または腫瘍細胞を殺傷する方法において、前記のT細胞と腫瘍細胞を接触させることができる。